

INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : B01D 69/02, 67/00, B01J 20/00, C12N 11/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/07702 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02429 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. August 1999 (02.08.99) (30) Prioritätsdaten: 198 36 180.7 3. August 1998 (03.08.98) DE 198 55 290.4 24. November 1998 (24.11.98) DE 199 36 992.5 2. August 1999 (02.08.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): POLY-AN GMBH [DE/DE]; Rudower Chaussee 30, D-12489 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ULBRICHT, Mathias [DE/DE]; Landsberger Allee 89, D-10407 Berlin (DE). PILETSKI, Sergiy [UA/UA]; Teremkovskaya, 21/4, Kiev 187 252187 (UA). SCHEDLER, Uwe [DE/DE]; Torstrasse 12, D-10119 Berlin (DE). MATUSCHEWSKI, Heike [DE/DE]; Schillingstrasse 30, D-10179 Berlin (DE). (74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, D-10315 Berlin (DE).			(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
(54) Title: TEMPLATE-TEXTURED MATERIALS, METHODS FOR THE PRODUCTION AND USE THEREOF (54) Bezeichnung: TEMPLAT-GEPRÄGTE MATERIALIEN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG (57) Abstract <p>The invention relates to template-textured materials in the form of template-textured polymers (TGP) on various surfaces including membranes (TGM template-textured membranes). Said materials are created by modifying the surface of solid carriers, which, by cross-linking polymerization of functional monomers initiated on the surface of said solid carriers in the presence of a template, leads to stable template prints that subsequently bind template molecules or template derivatives in a specific manner. The invention also relates to methods for the production of TGPs and to the use thereof for substance-specific separation of materials.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Templat-geprägte Materialien in Gestalt Templat-geprägter Polymere (TGP) auf beliebigen Oberflächen, wozu auch Membranen gehören (Templat-geprägte Membranen, TGM). Sie entstehen durch Modifizierung der Oberfläche von festen Trägern, die auf dem Wege einer an der Trägeroberfläche initiierten vernetzenden Polymerisation funktioneller Monomere in Gegenwart eines Templates zu stabilen Templatabdrukken führt, die anschließend Templatmoleküle oder Templatderivate spezifisch binden. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung von TGP und ihre Verwendung für die substanzspezifische Stofftrennung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

TEMPLAT-GEPRÄGTE MATERIALIEN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft neuartige Templat-geprägte Materialien in Gestalt Templat-geprägter Polymere (TGP) aus wäßrigen Lösungen sowie TGP auf einem festen Träger (z.B. Membranen), Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung für die substanzspezifische Stofftrennung.

10

In der Biotechnologie benötigt man für Produkte wie Enzyme, monoklonale Antikörper oder rekombinante Proteine neue effiziente Trenn- und Reinigungsstrategien. Dies gilt auch für synthetische Wirkstoffe, insbesondere wenn sie eine komplexere Struktur oder/und ein höheres Molekulargewicht bzw. eine eingeschränkte Stabilität aufweisen.

15 Für alle diese Anwendungsgebiete werden substanzspezifische Hochleistungsmaterialien gesucht, wobei eine große Flexibilität in Anpassung an die speziellen Targets erforderlich ist. Vorzugsweise werden feste Materialien (Partikel, Filme) eingesetzt, um die Phasentrennung von festen und flüssigen Stoffströmen zu vereinfachen. Im Unterschied zu Trennverfahren, die auf unterschiedlichen physikalischen Eigenschaften beruhen, ist die chemische Affinität
20 zum Träger die Voraussetzung für substanzspezifische Trennungen. Substanzspezifität kann durch biologische oder biomimetische Rezeptoren erzielt werden. Für Affinitätstrennungen werden bislang entweder spezifische, aber sehr empfindliche biologische Liganden (z.B. Antikörper, Enzyme) oder relativ unspezifische synthetische Liganden (z.B. Farbstoffe, Metallchelate) verwendet; Beispiele sind Chromatographie, Festphasenextraktion, Membrantrennung, Festphasenassays oder Sensoren (D. Sii, A. Sadana, *J. Biotechnol.* 19 (1991) 83).

25

Porenfreie Filme bzw. Schichten oder Partikel mit affinen Liganden an der Oberfläche besitzen eine beschränkte Bindungskapazität; bei porösen Materialien mit größerer spezifischer Oberfläche und Bindungskapazität treten typischerweise Einschränkungen der Bindungskapazität durch Diffusionslimitierungen auf. Gerichtet durchströmbare poröse Membranen sind
30 deshalb besonders attraktive alternative Materialien. Etablierte Membranverfahren mit porösen Membranen wie Mikro- oder Ultrafiltration (MF oder UF) funktionieren nach dem Größenausschlußprinzip (W. Ho, K. Sirkar (Eds.), *Membrane Handbook*, van Nostrand Reinhold, New York, 1992). Die Trennung von Substanzen ähnlicher Molekülgröße mit porösen Membranen erfordert zusätzlich spezifische (Affinitäts-) Wechselwirkungen mit der Membran (E.

Klein, *Affinity Membranes*, John Wiley & Sons, New York, 1991).

Die Hauptmotivation für die Anwendung von Affinitätsmembranen besteht in der Möglichkeit der gerichteten Anströmung trennspezifischer Gruppen (Liganden/Rezeptoren), die sich in großer Dichte in den Poren befinden. Damit wird eine drastische Verbesserung der Effektivität (geringerer Druckabfall, kürzere Verweilzeiten, höhere Durchsatzgeschwindigkeiten, kaum Diffusionslimitierung in Poren, schnellere Equilibrierung) im Vergleich zu analogen Prozessen mit Partikeln möglich (D. K. Roper, E. N. Lightfoot, *J. Chromatogr. A* 702 (1995) 3). Solche Affinitätsmembranen können für Stofftrennungen, vorzugsweise von Proteinen, aber auch vieler anderer Substanzen (z.B. Peptide, Nukleinsäurederivate, Kohlehydrate oder verschiedene Toxine, Herbizide, Pestizide) bis zu Zellen genutzt werden (US 5766908). Außerdem ergeben sich vielfältige Anwendungsmöglichkeiten in der Analytik, wie z.B. zur hochselektiven Probenanreicherung oder auch zur Dekontamination von Stoffströmen (DE 19609479).

Eine sehr attraktive Alternative zu biologischen oder biomimetischen Affinitäts-Liganden/Rezeptoren, z.B. für Chromatographie oder Analytik, wurde in den letzten Jahren entwickelt. Dies ist die Nutzung von spezifischen, aber sehr robusten funktionellen Kavitäten ("molekularen Abdrücken") in synthetischen Polymeren, hergestellt durch molekular prägende Polymerisation (G. Wulff, *Angew. Chem.* 107 (1995) 1958; K. Mosbach, O. Ramström, *Bio/Technology* 14 (1996) 163; A.G. Mayes, K. Mosbach, *Trends Anal. Chem.* 16 (1997) 321). Dazu realisiert man eine Polymerisation von Monomeren in Gegenwart von Templatmolekülen (z.B. Protein, Nukleinsäure, niedermolekulare organische Substanz), die mit einem funktionellen Monomer einen während der Polymerisation relativ stabilen Komplex bilden können. Nach dem Auswaschen des Templates können die so hergestellten Materialien Templatmoleküle wieder spezifisch binden. Die so synthetisierten Polymere heißen Templatgeprägte Polymere (TGP) / molekular geprägte Polymere (MIP) oder "Fingerabdruck"-Polymere (s. Fig. 1, Fig. 2).

Auf diese Weise sind z.B. die Herstellung polymerer Sorbentien in Gegenwart kleiner organischer Moleküle (Patent US 5110833) bzw. makromolekularer Substanzen (US 5372719) oder die Synthese von Acrylamid- bzw. Agarosegelen in Gegenwart von Proteinen beschrieben worden (Patente US 5728296, US 5756717). Auch Peptid- bzw. Proteinspezifische Sorbentien, hergestellt durch "Oberflächenprägen" von Metallchelatsstrukturen auf speziell funktionalisierte Partikeln, wurden beschrieben (US 5786428). In allen Fällen wurden hohe Affinitäten für die jeweiligen Template erhalten. Die Anwendung von durch molekulares Prägen herge-

stellten künstlichen Antikörpern und Rezeptoren hat sehr große Vorteile, weil diese Strukturen viel stabiler als ihre natürlichen Analoga sind. Außerdem können sie für jede Substanz (selbst für solche mit wenig ausgeprägten Antigen-Eigenschaften, wie z.B. kleine Moleküle oder Immunodepressiva) synthetisiert sowie wesentlich einfacher und kostengünstiger als die entsprechenden Biomoleküle hergestellt werden.

Die Auswahl der Komponenten für die Synthese eines *TGP* erfolgt vor allem aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Templat und funktionellem Monomer. Mit dem Ziel, diese Wechselwirkungen möglichst effektiv und für Affinitätswechselwirkungen zugänglich zu "fixieren", werden zusätzlich geeignete Vernetzer und Lösungsmittel gewählt.

Jede Substanz mit definierter dreidimensionaler Gestalt (Form) kann als Templat für die Synthese von *TGP* genutzt werden. Substanzklassen reichen folglich von kleinen Molekülen mit Molekülmassen unter oder um 100 Da (z.B. Herbizide) bis zu Partikeln wie Viren, Bakterien oder Zellen. Allerdings sind Verbindungen mit biologischer Funktion wie Proteine, Peptide, Nukleinsäuren oder Kohlehydrate von besonders großem Interesse. Die Erkennung von Templaten durch *TGP* basiert auf der Kombination verschiedener Faktoren wie reversibler kovalenter oder nichtkovalenter Bindung, elektrostatischer und hydrophober Wechselwirkungen sowie der Komplementarität der Gestalt (Form). Welcher dieser Faktoren dominiert, ist von der Polymerstruktur, den Templateigenschaften sowie den Bindungsbedingungen abhängig. Z.B. sind in hydrophoben Lösungsmitteln oft elektrostatische Wechselwirkungen für die Templaterkennung durch *TGP* dominierend. Dagegen sind in polaren Lösungsmitteln hydrophobe Wechselwirkung sowie die Gestaltspezifität am wichtigsten für die Templaterkennung. Vorzugsweise sollten *TGP* unter Bedingungen synthetisiert werden, die starke, aber reversible Wechselwirkungen zwischen dem Polymer und dem Templat favorisieren. Für große Moleküle (100...100000 Da) kann dagegen auch eine Kombination von vielen schwächeren Bindungen unter Einbeziehung von Wasserstoffbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen günstig sein. Für kleine Moleküle (50...100 Da) sind wenige starke Wechselwirkungen wie z.B. ionische Bindungen notwendig, um *TGP* mit hoher Affinität zu erhalten.

Wasser als Lösungsmittel oder wässrige Systeme generell sind natürlich im Zusammenhang mit den o.g. Anwendungen von besonderem Interesse. Von der Natur "optimierte" Ligand/Rezeptor-Systeme funktionieren unter diesen Bedingungen optimal. In der Synthese von *TGP* für Anwendungen in wässrigen Systemen gibt es dagegen erst in jüngster Zeit erste Fortschritte (L. Andersson, *Anal. Chem.* 68 (1996) 111; S. Hjerten, J. L. Liao, K. Nakazato, Y. Wang, G. Zamaratskaia, H. X. Zhang, *Chromatographia* 44 (1997) 227). Besondere Probleme

bereiten Synthesen von *TGP*-Rezeptoren für kleinere Moleküle. Offensichtlich ist es bislang in solchen Versuchen nur unvollkommen gelungen, neben der Wahl geeigneter Wechselwirkungskräfte auch die detailgetreue Anordnung der funktionellen Gruppen zu steuern.

Der Erfindung liegen die Aufgaben zugrunde, den bekannten Stand durch die Entwicklung von Templat-geprägten Materialien zu verbessern. Die Aufgaben wurden dadurch gelöst, daß neuartige Templat-geprägte Polymere (*TGP*), z.B. auf Oberflächen fester Formkörper als Träger synthetisiert werden.

Die vorliegende Erfindung umfaßt ein allgemeines Polymerisationsverfahren; in prinzipiell bekannter Weise ist unter den speziellen erfindungsgemäßen Bedingungen (s.u.) auch die Synthese von *TGP*-Partikeln möglich. Da diese Partikel aber aufgrund der bevorzugten was-
serlöslichen Monomere und wäßrigen Bedingungen (s.u.) mehr oder wenig starken Hydrogelcharakter aufweisen, erfolgt vorzugsweise die Synthese dünner *TGP*-Schichten auf festen, vorzugsweise polymeren, Trägern. Dieses Oberflächenprägen führt durch eine selektiv an der Trägeroberfläche initiierte, kontrollierte vernetzende Polymerisation in Gegenwart von Templatmolekülen zu kovalent fixierten, dünnen Schichten mit Templatabdrukken auf der gesamten Trägeroberfläche, beispielsweise einer Membran (*TGM*). Aufgrund der Selektivität der Initiierung bleiben Matrix- bzw. Porenstruktur intakt. Somit kann eine unabhängige Optimierung von Porenstruktur (Kapazität, Permeabilität) und Oberflächenfunktionalität (Spezifität durch Templatabdrukke) durch ein spezielles Herstellungsverfahren erreicht werden. Mögliche Template sind z.B. kleine Moleküle mit Molekülmassen unter oder um 100 Da (u.a. Herbizide), größere Moleküle wie Peptide, Proteine, Nukleinsäuren oder Kohlehydrate, oder auch Partikel wie Viren, Bakterien oder Zellen. Bei der Filtration durch oder der Applikation auf *TGP* können die Template oder Templatderivate auch aus verdünnten Lösungen in den Templatabdrukken (funktionellen Kavitäten) mit hoher Spezifität gebunden werden. Dann können die Template oder Templatderivate ggf. gereinigt und anschließend entweder unter Filtrationsbedingungen (als Konzentrat) eluiert oder direkt auf dem Träger nachgewiesen werden.

Polymere Membranen können durch Verfahren wie Fällungsmittel- oder Temperatur-induzierte Phaseninversion in einer Vielzahl von Porenstrukturen sowie mit den gewünschten mechanischen etc. Eigenschaften hergestellt werden. Damit ist eine Auswahl optimaler poröser Matrixmembranen für die gewünschten Trennprozesse möglich (E. Klein, *Affinity Membranes*, John Wiley & Sons, New York, 1991).

Die Auswahl der Komponenten für ein Templat-spezifisches *TGP* erfolgt vor allem aufgrund der Wechselwirkungen zwischen Templat (*T*) und funktionellem Monomer (*FM*). Mit dem

Ziel, diese Wechselwirkungen möglichst effektiv und für Affinitätswechselwirkungen zugänglich zu "fixieren", werden geeignete Vernetzer (*V*) und Lösungsmittel (*LM*) gewählt. Die Synthese der *TGP*-Schichten erfolgt dann *in situ* durch reaktive Beschichtung der gesamten Trägeroberfläche, z.B. Membran, aus einem Reaktionsgemisch niedriger Viskosität, aber unter Erhalt des Komplexes aus *T* und *FM*. Diese Funktionalisierung der Membran mit *TGP* erfolgt derart, daß sowohl die Porenstruktur als auch die Stabilität der Matrixmembran nicht beeinträchtigt werden, daß aber auch eine Blockierung der (transmembranen) Poren minimiert wird.

Um diese Anforderungen zu erfüllen, ist eine photochemische Initiierung einer heterogenen Pfropfcopolymerisation (z.B. funktioneller Acrylate) zur *TGP*-Synthese besonders bevorzugt. Dafür resultiert folgender prinzipieller Ablauf der Funktionalisierung:

1. Beschichtung des Trägers mit Photoinitiator (*PhI*)
2. Equilibrieren des Trägers mit dem Reaktionsgemisch (*T*, *FM*, *V*, *LM*, *PhI*),
im Falle von Membranen: Füllen und Equilibrieren des Porenvolumens der Matrix-
membran mit dem Reaktionsgemisch,
3. UV-Belichtung: selektive Anregung des *PhI*, Erzeugung von Startradikalen an der Oberfläche des Trägers, Polymerisation (vorzugsweise Temperatur, $T \leq 25^\circ\text{C}$),
4. Extraktion von unumgesetzten Reaktanden, löslichem Homopolymer und *T*.

Diese Funktionalisierungen basieren auf der Wirkung des Trägermaterials als Coinitiator, d.h. alle Polymere, aus denen sich photoinitiert Radikale generieren lassen, die eine Pfropfcopolymerisation starten können, lassen sich auf diese Weise modifizieren. Die *TGP*-Funktionalisierungen sind aus wäßrigen oder organischen Lösungsmitteln möglich. Über Initiierungs- und Polymerisationsbedingungen lassen sich Funktionalisierungsgrad und damit Oberflächenbedeckung der Matrix steuern. Falls erforderlich, kann so auch eine Blockierung der Matrixmembranporen im Falle von *TGM* minimiert werden. Damit ist die Anwendung des für die *TGP*-Synthese etablierten Methodenarsenals auf die Oberflächenfunktionalisierung von Trägermaterialien möglich.

Für die Photofunktionalisierung wurde ein bisher noch nicht bekanntes Zusammenspiel zwischen Adsorption des *PhI* und des *T* an der (Membran)Polymeroberfläche sowie den Polymerisationsbedingungen beobachtet. Von einem hydrophilen Polymer (z.B. Nylon) kann ein adsorbierter hydrophober *PhI* (z.B. Benzophenon) durch ein hydrophiles *T* (z.B. Terbumeton) verdrängt werden; die Photofunktionalisierung wird dadurch unterdrückt. Ein solches System ist zur *TGP*-Synthese nicht geeignet. Ein hydrophiler *PhI* (z.B. Benzophenoncarbonsäure)

dagegen coadsorbiert mit dem hydrophilen *T* am hydrophilen Polymer; die Photofunktionalisierung ist dadurch hinreichend effektiv; das *T* bindet spezifisch an dem so synthetisierten *TGP*. Ein hydrophober *PhI* (z.B. Benzophenon) adsorbiert bevorzugt an einem hydrophoben Polymer (z.B. Polypropylen); die Photofunktionalisierung ist effektiv; für ein hydrophileres *T* (z.B. Terbumeton) dominieren die Bindungen zu Templatabdruken im Pfcropfcopolymer. Daraus können unterschiedliche *TGP*-Strukturtypen abgeleitet werden (s. Fig. 3):

- a) Templatabdruken innerhalb oder/und an der Oberfläche einer vernetzten Pfcropfcopolymer-schicht, die an der Trägoberfläche fixiert ist,
- b) Templatabdruken direkt an der Trägoberfläche unter Beteiligung des Matrixpolymers.

10 Auch eine chemische Pfcropfung von Polymeren bzw. Polymervernetzung (z.B. Synthese von Polyanilinderivaten) auf der Oberfläche einer Matrixmembran ist zur Herstellung von *TGP* geeignet.

Template. Geeignete Substanzklassen reichen von kleinen Molekülen mit Molekülmassen unter oder um 100 Da (z.B. Herbizide) bis zu Partikeln wie Viren, Bakterien oder Zellen. Die Templatkonzentrationen in der Monomermischung für die *TGP*-Herstellung betragen zwischen 0,01 und 50 %. Mit der vorliegenden Erfindung können auch in wäßrigen Systemen ionische und elektrostatische Wechselwirkungen sowie Wasserstoffbrückenbindungen zur Synthese von *TGP* und somit zur molekularen Erkennung genutzt werden. Hydrophobe Wechselwirkungen können einen zusätzlichen Beitrag liefern. Dies ergibt insbesondere für kleine Moleküle signifikante Verbesserungen und ist auch für biologisch relevante Moleküle wie z.B. Aminosäuren, Peptide, Nucleinsäuren, Oligonucleotide, Zucker sowie Oligosaccharide, aber auch für Proteine oder DNA und RNA nutzbar.

Funktionelle Monomere mit positiv oder negativ geladenen funktionellen Gruppen (z.B. Ammonoethylacrylat-Derivate oder Acrylsäure bzw. Methacrylsäure) sind für die *TGP*-Synthese geeignet. Zusätzlich können hydrophobe Einheiten wie z.B. aromatische Ringe, Kryptanden oder Cyclodextrine in *TGP* eingebaut werden. Auch zur Komplexbildung befähigte Monomere wie Metallchelatkomplexe, Schiff'sche Basen und spezielle Ester können für die Herstellung von *TGP* genutzt werden. Auch Anilin und -derivate mit weiteren funktionellen Gruppen können für die *TGP*-Synthese genutzt werden. Weiterhin sind z.B. auch Derivate der Phenylboronsäure, die mit Diolen Ester bilden können, als funktionelle Monomere geeignet. Die Konzentration funktioneller Monomere in der Mischung kann zwischen 0 und 100% betragen. Die Lösungsmittel für die Polymerherstellung können das Monomer selbst, Wasser (Puffer), organische Lösungsmittel oder deren Mischungen sein. Generell hängt der optimale Mono-

mertyp für *TGP* von der Templatstruktur sowie den Polymerisationsbedingungen ab. In Abhängigkeit von den Polymerisationsbedingungen sowie der Zusammensetzung können die geprägten Polymere in der gewünschten Dichte, Porosität, Vernetzungsdichte und Konsistenz hergestellt werden. Beispiele für Vernetzer sind Ethylenglycolbismethacrylat für funktionelle Acrylate, o-Phenylendiamin für Polyanilin, N,N-Methylenbisacrylamid oder Piperazin-bisacrylamid für Acrylamid oder Bisepoxide für Agarose. Die Vernetzerkonzentrationen in der Monomermischung betragen zwischen 0 und 80%.

Um das Templat wieder aus dem *TGP* herauszuwaschen, können z.B. eine Säure, die die elektrostatischen Wechselwirkungen stört, eine Salzlösung mit einer zur Dissoziation ausreichenden Ionenstärke oder ein Lösungsmittel mit anderer Polarität verwendet werden. Dadurch werden in den Poren oder/und an der Oberfläche des Polymers die zur Templatstruktur komplementären Bindungsstellen wieder freigesetzt. Allerdings sind auch Anwendungen von *TGP* mit gebundenem Templat möglich.

Durch Wahl der Funktionalisierungsstrategie bzw. -bedingungen können neben einer optimalen Spezifität der Templatabdruke auch die unspezifischen Wechselwirkungen von strukturell ähnlichen oder verschiedenen Substanzen mit dem *TGP* minimiert werden. Beispiele dafür sind die Optimierung des funktionellen Monomers und/oder des Vernetzers, Zusätze im Reaktionsgemisch (z.B. von hydrophilen Monomeren), Mehrschritt-Modifizierungen oder nachträgliche Derivatisierungen. Damit wird die Selektivität der *TGP* erhöht.

Die Strukturcharakterisierung der *TGP* erfolgt in prinzipiell bekannter Weise mit etablierten Verfahren, z.B. durch REM-Untersuchungen (REM - Raster-Elektronen-Mikroskop), FTIR-ATR-Spektroskopie (Fourier Transform Infrared - Attenuation of Total Reflexion; Infrarotspektroskopie mit Abschwächung der Totalreflexion), Funktionalgruppenanalytik mit photometrischen oder fluorimetrischen Methoden, Kontaktwinkelmessungen, Permeabilitätsmessungen sowie statische und dynamische Sorptionsexperimente mit dem Templat oder anderen strukturell ähnlichen bzw. verschiedenen Substanzen. Insbesondere die statischen und dynamischen Bindungskapazitäten der *TGP* für das Templat, in Abhängigkeit von *TGP*-Struktur und den Testbedingungen (Konzentration, Verweilzeit, applizierte Stoffmengen und Volumen, Spülbedingungen usw.) sind wesentlich im Hinblick auf die vielfältigen Anwendungen der *TGP*.

Template oder Templatderivate werden bei der Filtration durch oder der Applikation auf *TGP*, auch aus hoher Verdünnung, in den Templatabdruken mit hoher Spezifität gebunden. Dann können die Template oder Templatderivate ggf. gereinigt und anschließend entweder unter

Filtrationsbedingungen (als Konzentrat) eluiert oder direkt auf dem Träger nachgewiesen werden (s. Fig. 4).

Folgende Anwendungen ergeben sich aus der erfindungsgemäßen Lösung, ohne daß damit die Anwendungsmöglichkeiten auf die konkreten Fälle beschränkt werden soll:

- 5 1. Filtration (Perfusion) von Lösungen, aber auch gasförmige Gemischen, durch *TGP*,
2. Diffusion (Dialyse) oder Elektrodifffusion (-dialyse) durch *TGP*,
3. Anwendung von *TGP* in Festphasenextraktion, (Membran-)Chromatographie oder Elektrophorese,
4. Anwendung von *TGP* in Sensoren,
- 10 5. Anwendung von *TGP* als Katalysator,
6. Applikation von Lösungen, aber auch gasförmigen Gemischen, auf *TGP*; Beispiele Teststreifen, Blottingmembranen, Assays, Drugscreening.

Mit den synthetisierten *TGP* ist z.B. die effiziente und spezifische Aufkonzentrierung von Schadstoffen (Herbiziden) aus verdünnten Lösungen möglich (vgl. 1.). Das kann einerseits
15 dazu genutzt werden, solche Substanzen quantitativ zu eliminieren (Detoxifikation); andererseits ist aber auch eine definierte Anreicherung (analog zur Festphasenextraktion; vgl. 3.) für die folgende Spurenanalytik möglich. Z.B. die effiziente Hochreinigung von Proteinen, ein Prozeß von höchster Relevanz für die Biotechnologie, ist mit *TGP* ebenfalls möglich (vgl. 1). Auch dabei sind, in Abhängigkeit von Protein und Prozeß, sowohl die Analytik, eine Herstellung
20 lung in reiner Form, als auch eine Dekontamination möglich.

Der bekannte Stand läßt sich erfindungsgemäß durch neuartige *TGP* verbessern, die aus wäßrigen Reaktionsmischungen synthetisiert werden und unter wäßrigen Bedingungen, insbesondere in Gegenwart von Puffersalzen, auch hohe Spezifitäten aufweisen.

Ein Komplex zwischen *Templat* und funktionellem Monomer, der im wesentlichen auf ionischen Bindungen basiert, kann leicht durch erhöhte Salzkonzentration gespalten werden. Dieser Effekt kann zum einen für die Elution des Templates aus dem *TGP* genutzt werden,
25 schränkt aber zum anderen die Anwendbarkeit für Affinitätstrennungen, mit Ausnahme von wäßrigen Lösungen niedriger Ionenstärke, sehr stark ein.

Überraschenderweise führt nun der Zusatz von Salz (z.B. Puffer) während der Polymerisation
30 zu *TGP*, die eine hohe Affinität für Templatmoleküle bei ähnlich hoher Salzkonzentration (z.B. des Puffers unter den bevorzugten Anwendungsbedingungen) haben. Dieser Effekt kann phänomenologisch derart beschrieben werden, daß die Salzkonzentration in der Reaktionsmischung den Abstand der Funktionalgruppen, die an der Ionenaustauschwechselwirkung betei-

ligt sind, "einstellt". Im Verlauf der Synthese gelingt es offensichtlich, diese vorteilhafte Konstellation zu fixieren (synthetischer Rezeptor mit ionischen Funktionalgruppen im richtigen Abstand). Besonders effektiv läßt sich diese Verfahrensweise bei Oberflächenfunktionalisierungen fester Träger realisieren, die im folgenden beschrieben wird.

- 5 Durch Wahl der Funktionalisierungsstrategie bzw. -bedingungen können neben einer optimalen Spezifität der Templatabdrücke auch die unspezifischen Wechselwirkungen von strukturell ähnlichen oder verschiedenen Substanzen mit dem *TGP* minimiert werden. Beispiele dafür sind die Optimierung des funktionellen Monomers und/oder des Vernetzers, Zusätze im Reaktionsgemisch (z.B. von hydrophilen Monomeren), Mehrschritt-Modifizierungen oder
- 10 nachträgliche Derivatisierungen. Damit wird die Selektivität der *TGP* erhöht.

Die erfindungsgemäßen neuartigen Templat-geprägten Materialien bestehen aus Templat-geprägten Polymeren (TGP), die durch Modifizierung der Oberfläche von festen Trägern in wäßrigen oder organischen Reaktionslösungen erhalten werden und die auf dem Wege einer an der Trägeroberfläche initiierten vernetzenden Polymerisation funktioneller Monomere in

15 Gegenwart eines Templates zu stabilen Templatabdrücken führt. Anschließend können die Templatabdrücke Templatmoleküle oder Templatderivate auch aus wäßrigen, salzhaltigen Lösungen spezifisch binden.

Die erfindungsgemäßen Templat-geprägten Membranen (TGM) werden durch Modifizierung der Oberfläche von Membranen erhalten, die auf dem Wege einer an der Membranoberfläche

20 initiierten vernetzenden Polymerisation funktioneller Monomere in Gegenwart eines Templates zu stabilen Rezeptorstrukturen in Form von Templatabdrücken führt, die anschließend Templatmoleküle oder Templatderivate spezifisch binden können.

Das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung Templat-geprägter Materialien besteht darin, daß ausgehend von einer porösen Membran unter Erhalt der makropösen Struktur und

25 spezifischen Oberfläche synthetisiert wird und sowohl eine große Templat-Bindungskapazität als auch eine hohe Permeabilität der Templat-geprägten Membran erzielt werden. Die Synthese der Templatabdrücke erfolgt durch eine heterogene photoinitiierte vernetzende Pfropfcopolymerisation funktioneller Monomere auf der Trägeroberfläche.

Bei der erfindungsgemäßen Herstellung Templat-geprägter Materialien werden eine Substanz

30 vom H-Abstraktionstyp (Anlagerung eines Wasserstoffatoms aus der Umgebung) als Photoinitiator und das Trägerpolymer als Coinitiator eingesetzt, wobei die Initiierung durch Lichtanregung des Photoinitiators erfolgt.

Die Synthese der Templatabdrücke beruht auf einer chemisch initiierten vernetzenden Polymerisation funktioneller Monomere auf der Trägeroberfläche. Als Initiator wird eine Substanz

eingesetzt, die nach physikalischer oder chemischer Anregung Radikale oder andere Starter-spezies für eine Polymerisation erzeugt.

Als Trägermaterialien dienen organische Polymere wie z.B. Polypropylen, Polyethylen, Polystyren, Polysulfon, Polyamide, Polyester, Polycarbonat, Polyacrylnitril, Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluoroethylen, Polyacrylate, Polyacrylamide, Cellulose, Amylose, Agarose sowie deren jeweilige Derivate, Copolymere oder Blends der Polymeren.

Als Trägermaterialien werden ferner poröse Festkörper wie z.B. Gläser, Silikate, Keramiken oder Metalle bzw. deren Komposite, auch mit organischen Polymeren, eingesetzt.

Die Membranen weisen vorzugsweise symmetrische, aber auch asymmetrische Porenstrukturen und Porengrößen zwischen wenigen nm und 10 µm, bevorzugt 100 nm bis 5 µm auf.

Als Template dienen kleine Moleküle mit Molekülmassen unter oder um 100 Da, wie z.B. Herbizide, Wirkstoffe oder Aminosäuren, größere Moleküle wie Peptide, Proteine, Nukleinsäuren oder Kohlehydrate, oder auch Partikel wie Viren, Bakterien oder Zellen und als funktionelle Monomere polymerisationsfähige Verbindungen mit zur Wechselwirkung mit Template befähigten Gruppen, insbesondere Carboxyl-, Sulfonyl-, Sulfat-, Phosphat-, Amino- oder quartären Ammonium-Gruppen sowie jeweils deren Derivate, auch im Gemisch.

Durch eine nachträgliche oder vorherige zusätzliche Funktionalisierung oder Beschichtung wird die unspezifische Bindung von mit Template konkurrierenden Substanzen und Nicht-Template verringert.

In einer besonderen Ausgestaltung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden im Gemisch mit den funktionellen Monomeren auch Vernetzermomomere sowie Lösungsmittel für alle Komponenten des Reaktionsgemisches eingesetzt.

Bei der Herstellung Template-geprägter Polymere (TGP) läßt sich durch den Zusatz von Salz die Bindungsspezifität und -kapazität des Template-geprägten Polymers für das Template sowie Template-ähnliche Substanzen erhöhen, wobei als Träger Filme, Membranen, Fasern, Hohlfasern, Gewebe, Vliese oder Partikel, jeweils nichtporös oder porös, verwendet werden, jedoch das Template-geprägte Polymer auch trägerfrei in beliebiger Gestalt und Größe hergestellt ist.

Die erfindungsgemäße Verwendung der neuartigen Template-geprägten Materialien liegt in der Stofftrennung und/oder Analytik von flüssigen oder gasförmigen Stoffgemischen, die auf der spezifischen Bindung der Template oder Template-derivate bei der Perfusion oder Diffusion durch Template-geprägte Polymere oder der Applikation auf Template-geprägten Polymeren basieren, ferner in der substanzspezifischen Stofftrennung mittels

- Affinitätsfiltration durch eine Anordnung mit Template-geprägtem Polymer zur Aufkonzentrierung, Reinigung, Abtrennung oder analytischen Bestimmung von Substanzen,

- Dialyse oder Elektrodialyse durch ein Templat-geprägtes Material zur Aufkonzentrierung, Reinigung, Abtrennung oder analytischen Bestimmung von Substanzen,
- Festphasenextraktion, Chromatographie, Membranchromatographie oder Elektrophorese mit einem Templat-geprägten Polymer zur Aufkonzentrierung, Reinigung, Abtrennung oder analytischen Bestimmung von Substanzen,
- eines Templat-geprägten Polymers als Sensor oder Katalysator zur Reinigung, Abtrennung oder analytischen Bestimmung von Substanzen sowie
- eines Templat-geprägten Polymers als Blottingmembran oder Teststreifen oder Material für Assays oder zum Wirkstoff-Screening.

10

Die Merkmale der Erfindung gehen außer aus den Ansprüchen auch aus der Beschreibung hervor, wobei die einzelnen Merkmale jeweils für sich allein oder zu mehreren in Form von Kombinationen vorteilhafte schutzfähige Ausführungen darstellen, für die mit dieser Schrift Schutz beantragt wird. Die Kombination besteht aus bekannten (Membranen, Polymere) und neuen Elementen (Modifizierung der gesamten Oberfläche von Membranen mit Templat-geprägten Polymerschichten, Synthese dünner *TGP*-Schichten auf festen Trägern), die sich gegenseitig beeinflussen und in ihrer neuen Gesamtwirkung einen Gebrauchsvorteil und den erstrebten Erfolg ergeben, der darin liegt, daß nunmehr mit den synthetisierten *TGP* z.B. die spezifische Aufkonzentrierung von Schadstoffen aus verdünnten Lösungen (Bereicherung der Spurenanalytik) sowie z.B. die effiziente Hochreinigung von Proteinen - ein Prozeß von höchster Relevanz für die Biotechnologie - möglich ist und die *TGP*-Synthese in wäßrigen Systemen mit hoher Templat-Spezifität sowie die Anwendbarkeit der *TGP*-Synthese auf Oberflächen fester Formkörper als Träger gelingt.

- 25 Die Erfindung soll anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert werden, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein.

Ausführungsbeispiele

- 30 *Beispiel 1. Für das Herbizid Terbumeton (2-t-Butylamino-4-ethyl-6-methoxy-1,3,5-triazin) molekular geprägte Polypropylenmembran*

Eine Probe (6 cm²) einer PP-MF-Membran (2E HF, Akzo Nobel, Wuppertal) wird mit Chloroform extrahiert, getrocknet und gewogen; anschließend wird die Membran in einer Petrischa-

- le ($d = 10$ cm) mit 10 ml Reaktionslösung bestehend aus 5 mM Terbumeton (Templat), 25 mM Acrylsäure (funktionelles Monomer), 600 mM Ethylenglycolbismethacrylat (Vernetzer) und 5 mM Benzophenon (Photoinitiator) in Chloroform getränkt und überschichtet. Die Petrischale wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, $\lambda \geq 310$ nm) abgedeckt. Nach 30 min erfolgt die Belichtung bei Halblast an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) für insgesamt 9 min (9 Passagen durch Belichtungszone). Anschließend wird die Membran dreimal mit Chloroform/Essigsäure (98/2, v/v) sowie dreimal mit Chloroform extrahiert. Danach wird getrocknet und gravimetrisch der Modifizierungsgrad, TGP pro äußere Membranfläche, bestimmt: $DG = 3,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.
- 10 Eine nicht molekular geprägte Kontrollprobe wird nach analoger Vorschrift, aber ohne Templat, präpariert; der Modifizierungsgrad (Polymer pro äußere Membranfläche) beträgt: $DG = 2,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

- 15 *Beispiel 2. Für das Herbizid Terbumeton (2-t-Butylamino-4-ethyl-6-methoxy-1,3,5-triazin) molekular geprägte Nylonmembran*

- Eine Probe (6 cm^2) einer Ny-MF-Membran (2D, Akzo Nobel, Wuppertal) wird mit Chloroform extrahiert, getrocknet und gewogen; anschließend wird die Membran in einer Petrischale ($d = 10$ cm) mit 10 ml Reaktionslösung bestehend aus 1 mM Terbumeton (Templat), 5 mM Acrylsäure (funktionelles Monomer), 120 mM Ethylenglycolbismethacrylat (Vernetzer) und 1 mM Benzophenon-4-carbonsäure (Photoinitiator) in Chloroform getränkt und überschichtet. Die Petrischale wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, $\lambda \geq 310$ nm) abgedeckt. Nach 30 min erfolgt die Belichtung bei Halblast an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) für insgesamt 9 min (9 Passagen durch Belichtungszone). Anschließend wird die Membran dreimal mit Chloroform/Essigsäure (98/2, v/v) sowie dreimal mit Chloroform extrahiert. Danach wird getrocknet und gravimetrisch der Modifizierungsgrad (TGP pro äußere Membranfläche) bestimmt: $DG = 24,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Eine nicht molekular geprägte Kontrollprobe wird nach analoger Vorschrift, aber ohne Templat, präpariert, der Modifizierungsgrad (Polymer pro äußere Membranfläche) beträgt:

$DG = 30,0 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

- 30 Weitere Ergebnisse für variierte Präparationsbedingungen zeigt Tabelle 1.

Tabelle 1: Präparationsbedingungen und Ergebnisse für das Herbizid Terbumeton geprägte Polypropylenmembranen (PP) und Nylonmembranen (PA)

Initiator: 1 mM Benzophenon; * 1 mM Benzophenon-4-carbonsäure

Membran	Terbumeton (mM)	AA (mM)	EDMA (mM)	DG ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)
PP-MIP1 PP-K1	0,2	1	24	0 0
PP-MIP2 PP-K2	1	5	120	2,0 3,3
PP-MIP3 PP-K3	5	25	600	7,5 7,7
PP-MIP4* PP-K4*	1	5	120	0 3,3
PA-MIP1 PA-K1	0,2	1	24	0 13,2
PA-MIP2 PA-K2	1	5	120	1,7 17,6
PA-MIP3 PA-K3	5	25	600	0 0
PA-MIP4* PA-K4*	1	5	120	24,2 30,8

- 5 MIP molekular geprägte Membran,
 K nicht molekular geprägte Membran (Kontrolle),
 AA Acrylsäure,
 EDMA Ethylenglycolbismethacrylat,
 DG Modifizierungsgrad

10

Beispiel 3. Anwendung einer für Terbumeton molekular geprägten Polypropylenmembran zur Anreicherung von Herbiziden (Festphasenextraktion)

- Eine Probe ($4,9 \text{ cm}^2$) einer entsprechend Beispiel 1 modifizierten Membran wird in einen Filterhalter aus Stahl mit Luer-Lock-Anschluß (Schleicher & Schuell, Dassel) montiert. 10 ml einer Lösung des Herbizids (Terbumeton, Terbutryn, Desmetryn oder Terbutylazin) mit einer Konzentration im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-5} M in Wasser werden aus einer Spritze mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min quantitativ durch die Membran filtriert. Anschließend werden das Filtrat sowie 10 ml der Rohlösung mit jeweils 10 ml Chloroform extrahiert; die Herbizidkonzentrationen werden dann mit Hilfe der Gaschromatographie (Trennsäule HP5MS; Hewlet Packard GC System HP 6890 mit Masse-selektivem Detektor HP 5973) quantitativ bestimmt und auf diese Weise die in der Membran gebundene Menge ermittelt.
- 10 Repräsentative Ergebnisse für PP-MIP, PP-Kontrolle und PP-unmod. sowie $5 \cdot 10^{-7}$ M Herbizid in Wasser zeigen Fig. 5 und Tabelle 2.

Tabelle 2: Adsorptionskapazität einer molekular geprägten PP-Membran
(10 ml Herbizid-Lösung; Konzentration 10^{-5} M; Membranfläche 5 cm^2)

Membran	Adsorption							
	Terbumeton		Terbutylazin		Desmetryn		Terbutryn	
	%	nmol/cm ²	%	nmol/cm ²	%	nmol/cm ²	%	nmol/cm ²
PP	78	15,6	95	19,0	39	7,8	98	19,6
PP-K3	79	15,8	95	19,0	42	8,4	71	14,2
PP-MIP3	96	19,2	76	15,2	63	12,6	100	20,0

- 15 PP unmodifizierte Membran,
PP-K3 ohne Anwesenheit von Templat modifizierte Membran,
PP-MIP3 molekular geprägte Membran (T: Terbumeton)

Beispiel 4. Für Peroxidase geprägte Polypropylenmembran

- 20 Auf einer Membran aus Polypropylen wird Anilin nach folgender exemplarischer Vorschrift zu einem fest haftenden, homogenen, optisch transparenten Film polymerisiert (vgl. Figur 1, Figur 2): Zu 30 µl einer Lösung von Anilinhydrochlorid (720 mM) und Meerrettichperoxidase (1,67 mg/ml) in Wasser werden 20 µl Ammoniumperoxodisulfat (250 mM in Wasser) pipetiert, gründlich vermischt und bei Raumtemperatur unter Schütteln für 2 h zur Reaktion gebracht. Danach wird gründlich mit Wasser und anschließend mit 10 mM Natriumphosphatpuffer (pH = 7,5) gewaschen.
- 25

Beispiel 5: Ersatz von biologischen Rezeptoren in Assays durch molekular geprägte Polymermembranen

Membranen wurden wie in Beispiel 4 durch Peroxidase-TGP modifiziert. Die dabei erhaltenen modifizierten Oberflächen zeigen das Verhalten von künstlichen Antikörpern für Peroxidase. Um die Affinität der TGP-Oberflächen für das Templat Peroxidase zu demonstrieren, wird Meerrettichperoxidase aus Lösungen unterschiedlicher Konzentration adsorbiert und dann mit Hilfe von Wasserstoffperoxidzugabe sowie der Vis-Detektion, basierend auf der Empfindlichkeit des PANi-Films bestimmt. Die signifikant höheren Werte für die Peroxidase-TGP-Oberfläche im Vergleich zum sehr geringen Signal bei der nicht geprägten Kontrollprobe zeigen die höhere Bindung von Meerrettichperoxidase an den synthetischen Rezeptorstrukturen unter Sättigung der Sorptionskapazität im untersuchten Konzentrationsbereich.

Beispiel 6. Für das Herbizid Desmetryn (2-Isopropylamino-4-methylamino-6-methylthio-1,3,5-triazin) molekular geprägte Polypropylenmembranen

Eine runde Probe (46 cm²) einer PP-MF-Membran (nominale Porengröße, d = 0.2 µm; 2E HF, Akzo Nobel, oder d = 0.6 µm; AN 06, Millipore) wird mit Chloroform und Methanol extrahiert, getrocknet und gewogen. Danach wird die Membran für 30 min in eine 100 mM Lösung von BP (Photoinitiator) in Methanol getaucht. Anschließend wird die Membran, deren Poren noch mit der BP-Lösung gefüllt sind, in einer Petrischale (d = 10 cm) mit 20 ml Reaktionslösung, bestehend aus 10 mM Desmetryn (Templat), 50 mM AMPS (funktionelles Monomer), 100 mM MBAA (Vernetzer) und 0.1 mM BP in Wasser, überschichtet. Die Petrischale wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, λ > 310 nm) abgedeckt. Nach 30 min erfolgt die Belichtung an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) bei Halblast für insgesamt 10 min (10 Passagen durch die Belichtungszone). Anschließend wird die Membran intensiv mit Methanol, Wasser, 50 mM Salzsäure, Wasser und wieder Methanol gewaschen. Danach wird getrocknet und gravimetrisch der Modifizierungsgrad (DG, bezogen auf die äußere Membranoberfläche) bestimmt. Eine nicht molekular geprägte Kontrollprobe wird nach analoger Vorschrift, aber ohne Templat, präpariert. Ergebnisse für variierte Präparationsbedingungen (pH-Wert, Salzkonzentration) zeigt Tabelle 3.

Beispiel 7. Anwendung von Desmetryn-geprägten Polypropylenmembranen zur Anreicherung von Herbiziden (Festphasenextraktion)

Eine Probe (4.9 cm²) einer entsprechend Beispiel 6 funktionalisierten Membran (vgl. Tabel-

le 3) wird in einen Filterhalter aus Stahl mit Luer-Lock-Anschluß (Schleicher & Schuell, Dassel) montiert. 10 ml einer Lösung von Desmetryn mit einer Konzentration im Bereich von 10^{-7} bis 10^{-5} M in Wasser werden aus einer Spritze mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min quantitativ durch die Membran filtriert. Anschließend werden das Filtrat sowie 10 ml der Rohlösung mit jeweils 10 ml Chloroform extrahiert; die Herbizidkonzentrationen werden dann mit Hilfe der Gaschromatographie (Trennsäule HP5MS; Hewlet Packard GC System HP 6890 mit Masse-selektivem Detektor HP 5973) quantitativ bestimmt und auf diese Weise die in der Membran gebundene Menge ermittelt.

Repräsentative Ergebnisse sind in Tabelle 4 zusammengefaßt. Für beide Matrixmembranporengößen weisen die TGP-Membranen deutlich (TGP 1) bzw. signifikant (TGP 2) höhere Affinitäten für das Herbizid auf, während die mit einem chemisch ähnlichen, aber nicht geprägten Polymer modifizierten Membranen verglichen mit unmodifiziertem PP leicht erhöhte (K 1) oder sogar geringere (K 2) Werte aufweisen.

Das TGP-gebundene Herbizid kann durch pH-Wechsel oder erhöhte Salzkonzentration wieder aus der Membran eluiert werden; ein Beispiel zeigt Fig. 6.

In prinzipiell analoger Weise konnte das Herbizid aus einer $2 \cdot 10^{-9}$ M Lösung bei einer Wiederfindung von 90 % 1000fach angereichert werden; d.h. eine substanzspezifische Festphasenextraktion kann sowohl zur Aufreinigung als auch zur Aufkonzentrierung genutzt werden.

Die TGP-Membranen sind ohne Verlust an Spezifität und Kapazität nach einer einfachen Regeneration wiederholt einsetzbar, d.h. eine Anwendung zur Dekontamination ist so möglich (s. Fig. 7).

Beispiel 8. Substanz- bzw. Gruppenspezifität von Desmetryn-geprägten Polypropylenmembranen

Eine Probe (4.9 cm^2) einer entsprechend Beispiel 6 funktionalisierten Membran (TGP 1, s. Tabelle 3) wird wie in Beispiel 7 beschrieben getestet: 10 ml einer Lösung des jeweiligen Herbizids (Desmetryn, Terbumeton, Terbutryn oder Terbutylazin) mit einer Konzentration von 10^{-5} M in Wasser werden aus einer Spritze mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min quantitativ durch die Membran filtriert. Anschließend erfolgt wie in Beispiel 7 beschrieben die quantitative Analytik.

Aussagen zu der Spezifität des Prägens und der Gruppenspezifität der TGP-Membranen können aus den in Fig. 8 dargestellten Ergebnissen abgeleitet werden.

Für das Templat Desmetryn sowie Terbutryn und Terbumeton (jeweils Methoxy- bzw. Methylthio-substituierte s-Triazine) ist die Affinität von *TGP* größer als die von K. Für Terbutylazin (Chlor-substituiertes s-Triazin) sowie das 1,2,4-Triazin Metribuzin ist dagegen keine Spezifität zu beobachten. D.h., die Spezifität wird durch das Prägen erzeugt; auch Substanzen mit identischer Hydrophilie/phobie-Balance (Terbumeton und Terbutylazin, jeweils $\lg k_{ow} = 3.04$) werden aufgrund eines unterschiedlichen molekularen Details (Methoxy- vs. Chlor-Substituent) unterschiedlich durch den synthetischen Rezeptor gebunden ("Fit"). Es resultiert eine Gruppenspezifität für s-Triazine mit ähnlicher Substitution ("Polyklonalität", in Analogie zu Antikörpern).

Beispiel 9. Affinität von unterschiedlichen Desmetryn-geprägten Polypropylenmembran für Herbizide aus wäßrigen Pufferlösungen

Eine Probe (4.9 cm^2) einer entsprechend Beispiel 6 funktionalisierten Membran (s. Tabelle 3) wird wie in Beispiel 7 beschrieben getestet: 10 ml einer Lösung von Desmetryn mit einer Konzentration von 10^{-5} M in Pufferlösungen mit unterschiedlichem pH-Wert werden aus einer Spritze mit einer Geschwindigkeit von 10 ml/min quantitativ durch die Membran filtriert. Anschließend erfolgt wie in Beispiel 7 beschrieben die quantitative Analytik (s. Fig. 9).

Es ist zu sehen, daß bei den aus salzfreien Lösungen polymerisierten *TGP*-Membranen (vgl. Tabelle 3) die Affinität für die Herbizidbindung aus Pufferlösungen gering ist. Auch eine Synthese bei $\text{pH} = 5.5$, d.h. mit dem Natriumsalz des funktionellen Monomers AMPS, ergibt ähnlich geringe Affinitäten. Dagegen weisen die bei niedrigem pH unter Salzzusatz synthetisierten *TGP* bemerkenswert hohe Affinitäten für die Herbizidbindung aus 50 mM Pufferlösungen auf. Bei höheren pH-Werten sinkt die Affinität der *TGP*, offensichtlich, da die Salz- bildung immer stärker mit der Bindung des Herbizids im synthetischen Rezeptor konkurriert.

Beispiel 10. Ersatz von biologischen Rezeptoren (hier Anti-Atrazin-Antikörper) in Assays durch TGP-Oberflächen

Wells von 96er Mikrotiterplatten aus Polystyren wurden unter analogen Bedingungen wie in Beispiel 6 beschrieben, aber mit Atrazin als Templat, modifiziert:

Zunächst werden pro Well 250 μl einer 100 mM Lösung von BP (Photoinitiator) in Methanol pipettiert, und die Mikrotiterplatte wird für 60 min geschüttelt. Die Lösung wird entfernt und anschließend werden pro Well 250 μl der Reaktionslösung, bestehend aus 10 mM Atrazin

(Templat), 50 mM AMPS (funktionelles Monomer), 100 mM MBAA (Vernetzer) und 0.1 mM BP in Wasser pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit einer Glasplatte (Tief-UV-Filter, $\lambda > 310$ nm) abgedeckt. Nach 60 min erfolgt die Belichtung an einem UV-Trockner (Beltron GmbH) bei Halblast für insgesamt 10 min (10 Passagen durch die Belichtungszone).

- 5 Anschließend wird die Mikrotiterplatte intensiv mit Methanol, Wasser, 50 mM Salzsäure, Wasser und wieder Methanol gewaschen sowie anschließend getrocknet.

Die auf diese Weise erhaltenen modifizierten Oberflächen der Wells zeigen das Verhalten von künstlichen Antikörpern für Atrazin, was sich in einem kompetitiven Triazin-Assay nutzen läßt:

- 10 In unterschiedlichen modifizierten Wells werden jeweils 50 μ l einer Lösung von Herbizid (Atrazin oder Metribuzin) in Konzentrationen von 10^{-7} bis 10^{-4} M in Wasser sowie 50 μ l Atrazin-Peroxidase-Konjugate-Lösung (aus dem Pestanal Atrazin ELISA Kit; Riedel de Haen) pipettiert und unter Schütteln bei Raumtemperatur für 2 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgen Waschen, Entwickeln sowie Stoppen entsprechend der Vorschrift des kommerziellen
- 15 Assays (vgl. o.). Die Extinktionen bei 450 nm werden in einem Mikrotiterplattenlesegerät gemessen. Ergebnisse sind in Fig. 10 dargestellt. Mit unmodifizierten Mikrotiterplatten werden keine signifikanten Extinktionsänderungen erhalten.

20 Tabelle 3: Präparation von Desmetryn-geprägten PP-Membranen (Beschichtung mit BP; Lösungen in Wasser; 10 min UV-Belichtung bei Raumtemperatur).

	Poren, d_p (μ m)	Desmetryn c (mM)	Salzzusatz (c = 50 mM)	pH	Funktionalisierungsgrad DG (μ g/cm ²)
TGP1	0.2	10		1.5	863
K1	0.2	-		1.5	724
TGP2	0.6	10		1.5	178
K2	0.6	-		1.5	132
TGP3	0.2	10	NaCl	1.5	800
K3	0.2	-	NaCl	1.5	430
TGP4	0.2	10	Na ₃ PO ₄	2.1	933
K4	0.2	-	Na ₃ PO ₄	2.1	343
TGP5	0.2	10	Na ₃ PO ₄	5.1	1102
K5	0.2	-	Na ₃ PO ₄	5.1	559

Tabelle 4: Desmetrynsorption aus 10^{-5} M Lösungen des Herbizids in Wasser in Desmetryngeprägten Polypropylenmembranen sowie Kontrollproben (Filtrationsgeschwindigkeit 10 ml/min).

Membran	DG ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$)	Desmetrynsorption (%)
PP (0.2 μm)	-	48
TGP 1 (0.2 μm)	863	92
K 1 (0.2 μm)	724	57
PP (0.6 μm)	-	12
TGP 2 (0.6 μm)	178	16
K 2 (0.6 μm)	132	8

5

Abkürzungsverzeichnis

	AA	Acrylsäure,
	AMPS	2-Acyloylamino-propan-2-sulfonsäure
10	BP	Benzophenon
	DG	Funktionalisierungsgrad
	EDMA	Ethylenglycolbismethacrylat,
	FM	Funktionelles Monomer
	FTIR-ATR-Spektroskopie - Fourier Transform Infrared - Attenuation of Total Reflexion;	
15	Infrarotspektroskopie mit Abschwächung der Totalreflexion	
	K	Kontrolle, synthetisiert ohne Templat
	lg k _{OW}	Verteilungskoeffizient 1-Octanol/Wasser
	LM	Lösungsmittel
	MBAA	N,N'-Methylenbisacrylamid
20	MF	Mikrofiltration
	MIP	Molekular geprägte Polymere
	PhI	Photoinitiator
	PP	Polypropylen
	REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
25	T	Templat

TGM	Templat-geprägte Membranen
TGP	Templat-geprägte Polymere
UF	Ultrafiltration
V	Vernetzer

5

Legende zu den Figuren

Figur 1:

Schematische Darstellung der Synthese von Templat-geprägten Polymeren (TGP):

- 10 Templat-spezifische Bindungsstellen ("Templatabdrücke") werden durch vernetzte Polymerisation funktioneller Monomere oder Vernetzung funktioneller Polymere in Gegenwart eines Templats und anschließendes Auswaschen des Templats erzeugt.

Figur 2:

- 15 Schematische Darstellung der Modifizierung der Oberfläche von Membranen mit Templat-geprägten Polymeren - Herstellung von Templat-geprägten Membranen (TGM): Templat-spezifische Bindungsstellen ("Templatabdrücke") werden durch photoinitiierte vernetzte Pfropfcopolymerisation oder chemische Pfropfung bzw. Polymervernetzung funktioneller Monomere in Gegenwart eines Templats und anschließendes Auswaschen des Templats erzeugt.
- 20

Figur 3:

Strukturtypen von TGM:

- 25 a) Templatabdrücke innerhalb oder/und an der Oberfläche einer vernetzten Pfropfcopolymer-schicht, die an der Membranoberfläche fixiert ist
- b) Templatabdrücke direkt an der Membranoberfläche unter Beteiligung des Matrixpolymers

Figur 4:

Anwendungen von TGM:

- 30 a) Perfusion einer Lösung oder gasförmigen Mischung mit Templat durch die Membran
- b) Applikation einer Lösung oder gasförmigen Mischung mit Templat auf die Membran.
- In beiden Fällen kann anschließend zunächst Waschen und danach Elution bzw. direkte Analytik des Templats erfolgen.

Figur 5

Adsorptionskapazität einer molekular geprägten PP-Membran als Funktion der applizierten Stoffmenge eines ausgewählten Herbizids (Terbumeton).

5 PP-unmod: unmodifizierte PP-Membran

PP-K3: ohne Anwesenheit von Templat modifizierte Membran (Kontrolle)

PP-MIP3: molekular geprägte PP-Membran

Figur 6:

- 10** Freisetzung von in Desmetryn-geprägten PP-Membranen (TGP 1) gebundenem Desmetryn (nach Sorption aus 10^{-5} M Lösungen des Herbizids in Wasser) durch Filtration / Elution von / mit 10 ml Salzlösung.

Figur 7:

- 15** Wiederholte Anwendung von Desmetryn-geprägten PP-Membranen (TGP 1) zur Sorption von Desmetryn aus 10^{-5} M Lösungen des Herbizids in Wasser (Regeneration durch Waschen mit 50 ml Salzsäure und Wasser).

Figur 8:

- 20** Sorption verschiedener Herbizide aus 10^{-5} M Lösungen in Wasser in Desmetryn-geprägten PP-Membranen (TGP 1; Filtrationsgeschwindigkeit 10 ml/min).

Figur 9:

Einfluß des pH-Wertes auf die Sorption von Desmetryn aus 10^{-5} M Lösungen in 50 mM

- 25** Phosphatpuffer in Desmetryn-geprägten PP-Membranen (Filtrationsgeschwindigkeit 10 ml/min).

Figur 10:

Kalibrieren für die quantitative Bestimmung von Atrazin mit Atrazin-TGP-funktionalisierten

- 30** Mikrotiterplatten ohne Anti-Atrazin-Antikörper (Metribuzin als Kontrolle).

Patentansprüche

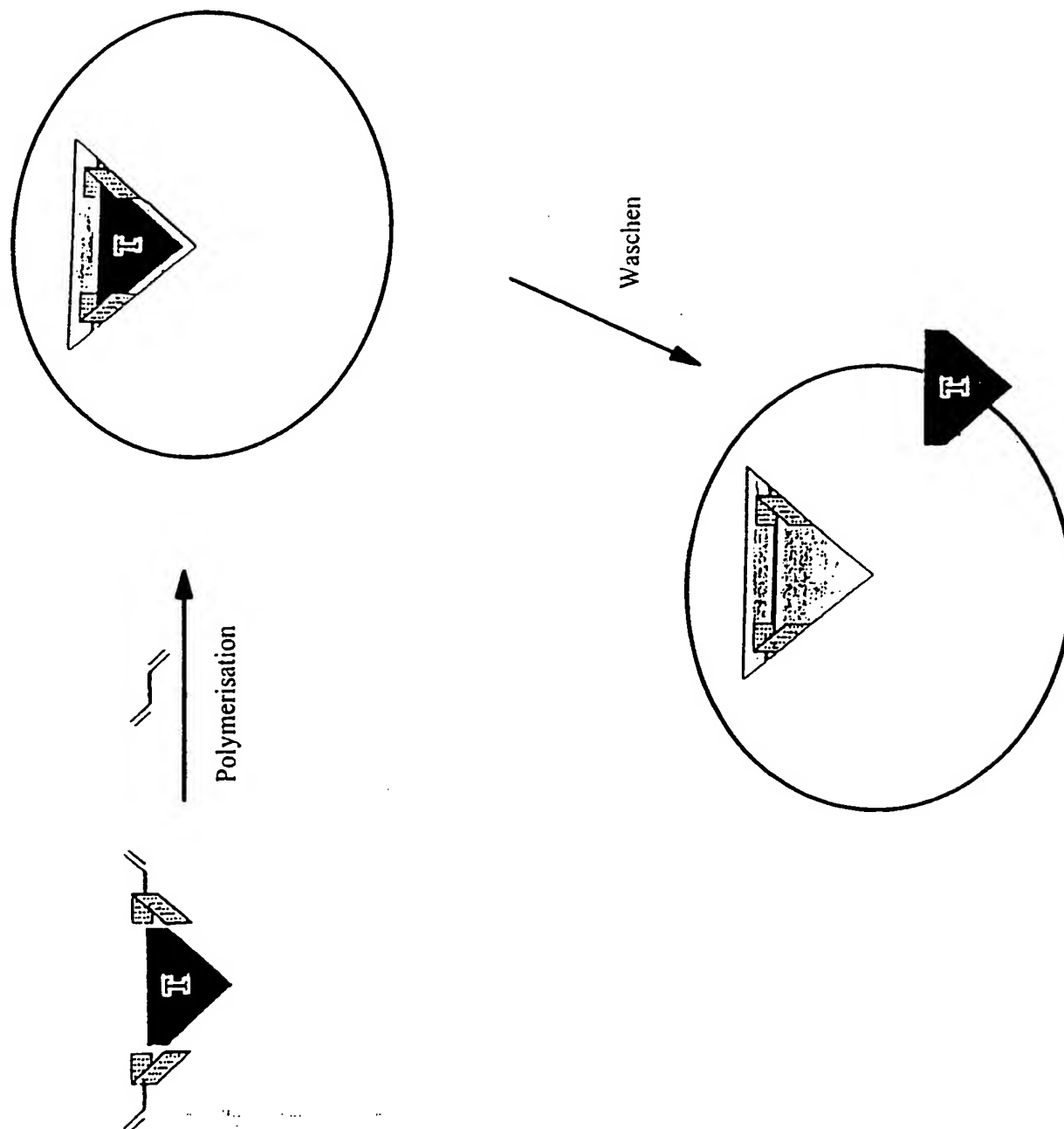
1. Neuartige Templat-geprägte Materialien, bestehend aus Templat-geprägten Polymeren (TGP) auf beliebigen Oberflächen, wozu Membranen gehören, erhalten durch Modifizierung der Oberfläche von festen Trägern sowohl in organischen als auch in wäßrigen oder wäßrig-salzhaltigen Reaktionslösungen, die auf dem Wege einer an der Trägeroberfläche initiierten vernetzenden Polymerisation funktioneller Monomere in Gegenwart eines Templates zu stabilen Templatabdrücken führt, die anschließend Templatmoleküle oder Templatderivate aus organischen oder auch aus wäßrigen, salzhaltigen Lösungen spezifisch binden.
2. Verfahren zur Herstellung Templat-geprägter Materialien nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß
 - 2.1. ausgehend von einer porösen Membran unter Erhalt der makropösen Struktur und spezifischen Oberfläche Templat-geprägte Membranen (TGM) synthetisiert und damit sowohl eine große Templat-Bindungskapazität als auch eine hohe Permeabilität der TGM erhalten werden.
 - 2.2. die Synthese der Templatabdrücke durch eine heterogene photoinitiierte vernetzende Pfropfcopolymerisation funktioneller Monomere auf der Trägeroberfläche erfolgt,
 - 2.3. eine Substanz vom H-Abstraktionstyp als Photoinitiator und das Membranpolymer als Coinitiator eingesetzt werden und die Initiierung durch Lichtanregung des Photoinitiators erfolgt,
 - 2.4. die Synthese der Templatabdrücke durch eine chemisch initiierte vernetzende Polymerisation funktioneller Monomere auf der Trägeroberfläche erfolgt,
 - 2.5. als Initiator eine Substanz eingesetzt wird, die nach physikalischer oder chemischer Anregung Radikale oder andere Starterspezies für eine Polymerisation erzeugt,
 - 2.6. als Trägermaterialien oder als Membranmaterialien organische Polymere wie z.B. Polypropylen, Polyethylen, Polystyren, Polysulfon, Polyamide, Polyester, Polycarbonat, Polyacrylnitril, Polyvinylidenfluorid, Polytetrafluoroethylen, Polyacrylate, Polyacrylamide, Cellulose, Amylose, Agarose sowie deren jeweilige Derivate, Copolymere oder Blends der Polymeren eingesetzt werden,
 - 2.7. als Trägermaterialien oder als Membranmaterialien poröse Festkörper wie z.B. Gläser, Silikate, Keramiken oder Metalle bzw. deren Komposite, auch mit organischen Polymeren, eingesetzt werden,

- 2.8. Membranen mit vorzugsweise symmetrischer, aber auch asymmetrischer Porenstruktur und Porengrößen zwischen wenigen nm und 10 μ m, bevorzugt 100 nm bis 5 μ m, eingesetzt werden,
 - 2.9. als Template kleine Moleküle mit Molekülmassen unter oder um 100 Da, wie z.B. Herbizide, Wirkstoffe oder Aminosäuren, größere Moleküle wie Peptide, Proteine, Nukleinsäuren oder Kohlehydrate, oder auch Partikel wie Viren, Bakterien oder Zellen dienen,
 - 2.10. als funktionelle Monomere polymerisationsfähige Verbindungen mit zur Wechselwirkung mit Templaten befähigten Gruppen, insbesondere Carboxyl-, Sulfonyl-, Sulfat-, Phosphat-, Amino- oder quartären Ammonium-Gruppen sowie jeweils deren Derivate, auch im Gemisch, eingesetzt werden,
 - 2.11. durch eine nachträgliche oder vorherige zusätzliche Funktionalisierung oder Beschichtung die unspezifische Bindung von mit Templat konkurrierenden Substanzen und Nicht-Templaten verringert wird.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß im Gemisch mit den funktionellen Monomeren auch Vernetzermomere sowie Lösungsmittel für alle Komponenten des Reaktionsgemisches eingesetzt werden.
 4. Verfahren zur Herstellung Templat-geprägter Polymere (TGP) nach den Ansprüchen 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, daß
 - 4.1. durch den Zusatz von Salz die Bindungsspezifität und -kapazität des Templat-geprägten Polymers für das Templat sowie Templat-ähnliche Substanzen erhöht wird,
 - 4.2. als Träger Filme, Membranen, Fasern, Hohlfasern, Gewebe, Vliese oder Partikel, jeweils nichtporös oder porös, verwendet werden,
 - 4.3. das Templat-geprägte Polymer trägerfrei in beliebiger Gestalt und Größe hergestellt wird.
 - 4.4. das Templat nach der Synthese nicht aus den Templatabdrücken entfernt wird.
 5. Verwendung der neuartigen Templat-geprägten Materialien nach den Ansprüchen 1 bis 4 zur Stofftrennung und/oder Analytik von flüssigen oder gasförmigen Stoffgemischen, die auf der spezifischen Bindung der Template oder Templatderivate bei der Perfusion oder Diffusion durch Templat-geprägte Polymere oder der Applikation auf Templat-geprägten Polymeren basieren.

6. Verwendung nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine substanzspezifische Stofftrennung mittels Affinitätsfiltration durch eine Anordnung mit Templat-geprägtem Polymer zur Aufkonzentrierung, Reinigung, Abtrennung oder analytischen Bestimmung von Substanzen erfolgt.
7. Verwendung nach den Ansprüchen 5 und 6 zur substanzspezifischen Stofftrennung mittels Dialyse oder Elektrodialyse durch ein Templat-geprägtes Material zur Aufkonzentrierung, Reinigung, Abtrennung oder analytischen Bestimmung von Substanzen.
8. Verwendung nach den Ansprüchen 5 bis 7 zur substanzspezifischen Stofftrennung mittels Festphasenextraktion, Chromatographie, Membranchromatographie oder Elektrophorese mit einem Templat-geprägten Polymer nach den Ansprüchen 1 bis 4 zur Aufkonzentrierung, Reinigung, Abtrennung oder analytischen Bestimmung von Substanzen.
9. Verwendung nach den Ansprüchen 5 bis 8 zur substanzspezifischen Stofftrennung oder/und Bindung oder/und chemischen Umwandlung durch ein Templat-geprägtes Polymer nach den Ansprüchen 1 bis 4 als Sensor oder Katalysator zur Reinigung, Abtrennung oder analytischen Bestimmung von Substanzen.
10. Verwendung nach den Ansprüchen 5 bis 9 zur substanzspezifischen Stofftrennung oder/und Bindung oder/und chemischen Umwandlung durch ein Templat-geprägtes Polymer nach den Ansprüchen 1 bis 4 als Blottingmembran oder Teststreifen oder Material für Assays oder zum Wirkstoff-Screening.

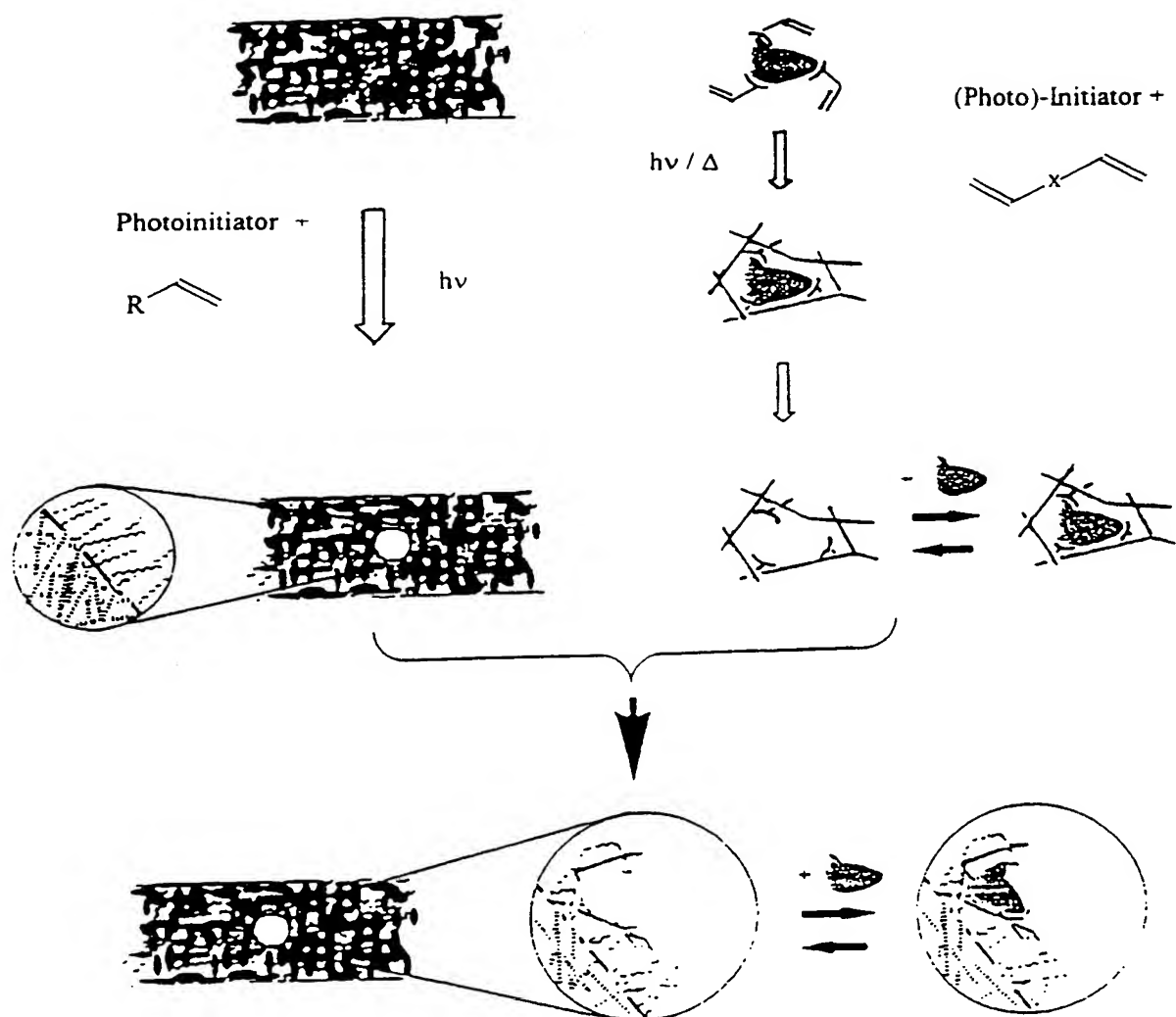
Figur 1

1/10



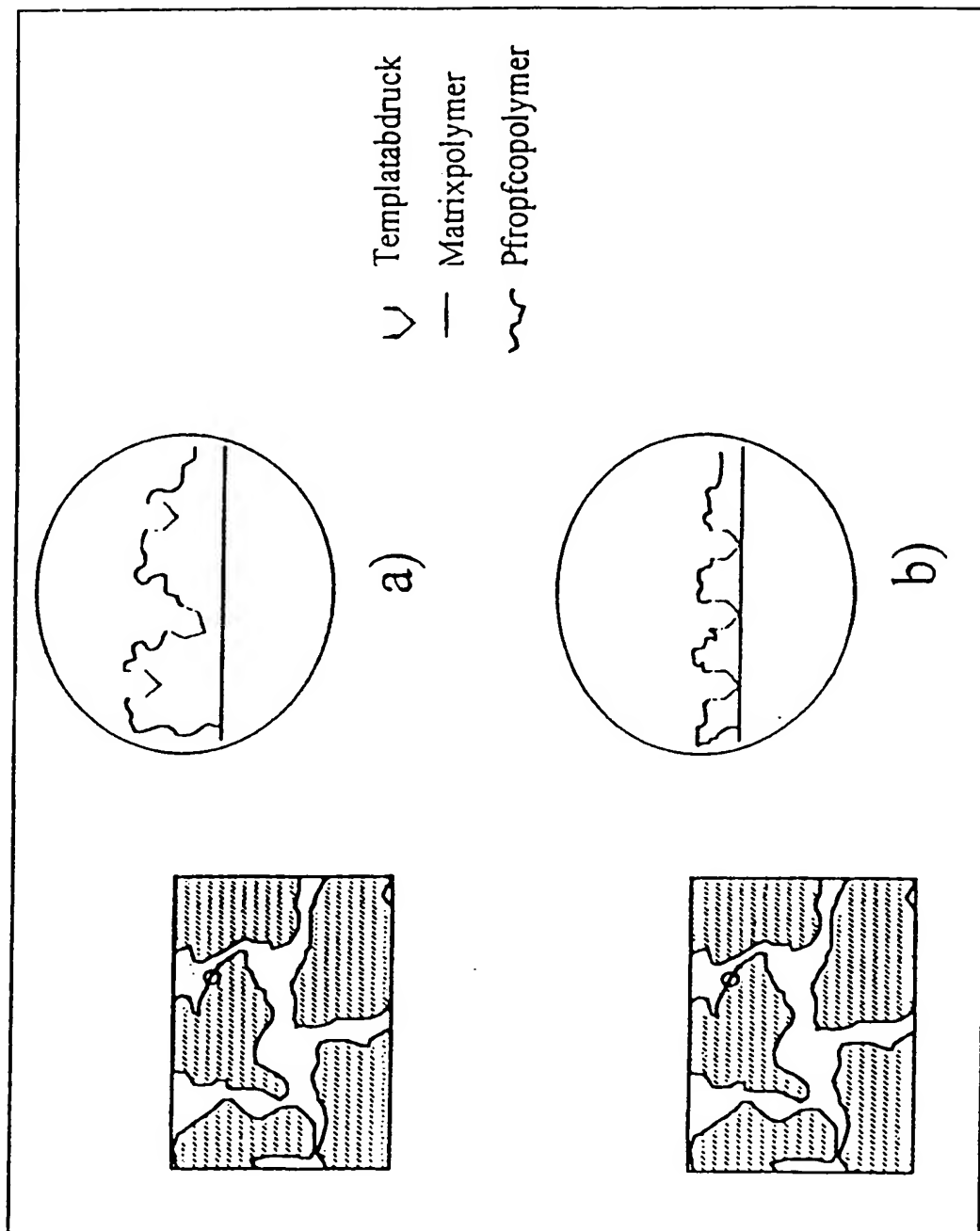
Figur 2

2/10

**Molekular geprägte Affinitätsmembranen**

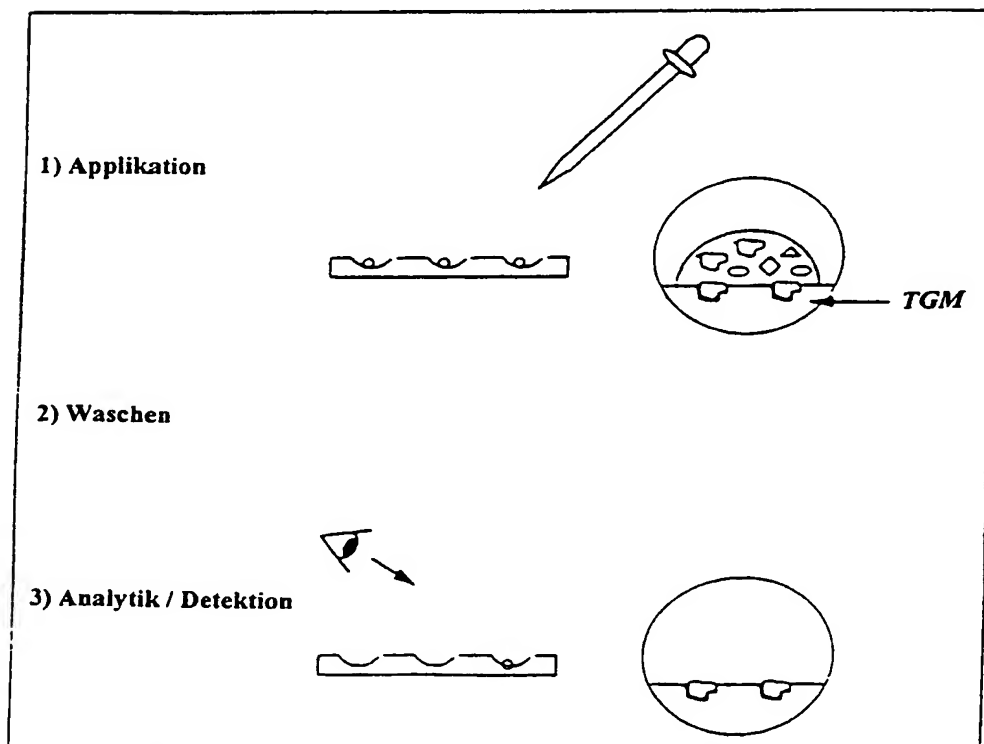
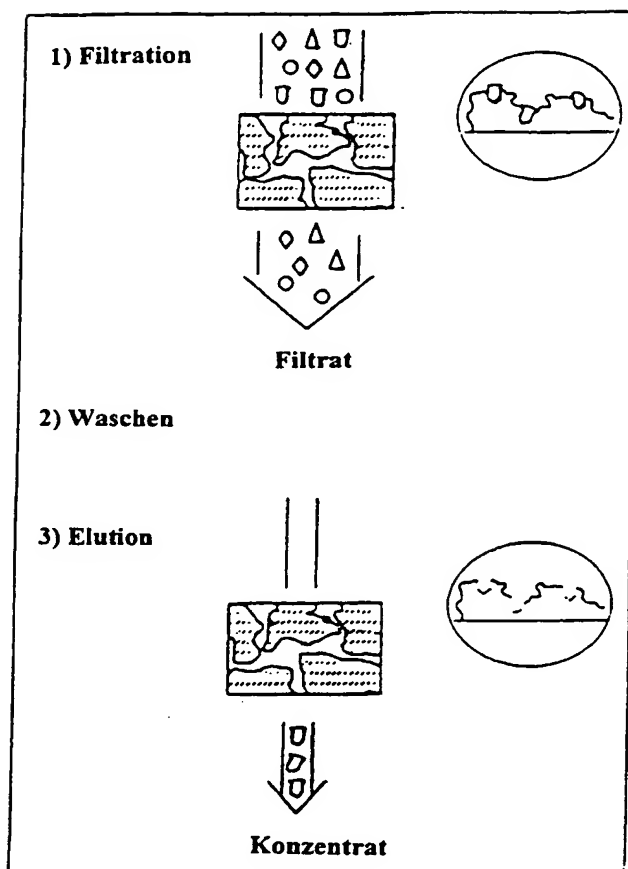
Figur 3

3/10



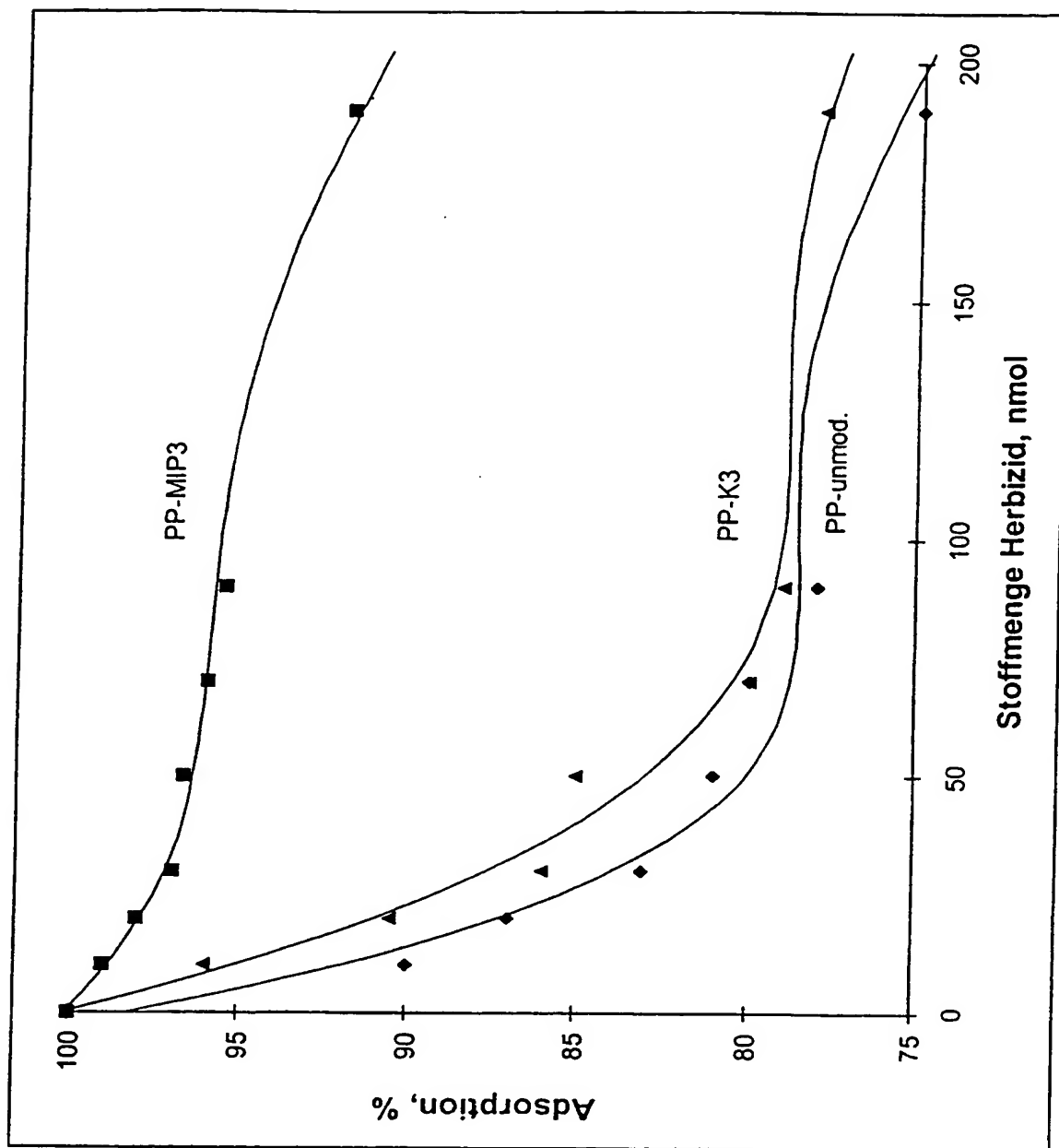
Figur 4

4/10



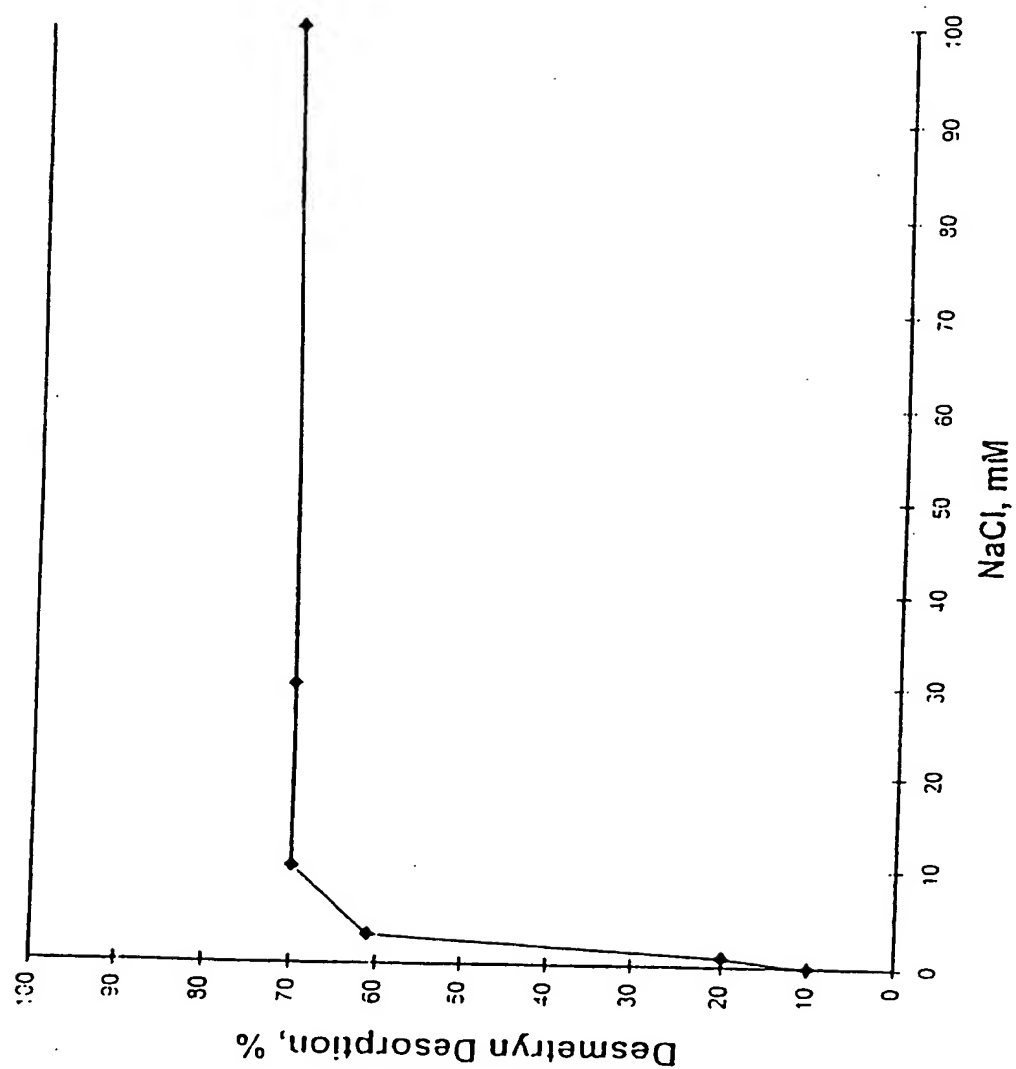
Figur 5

5/10



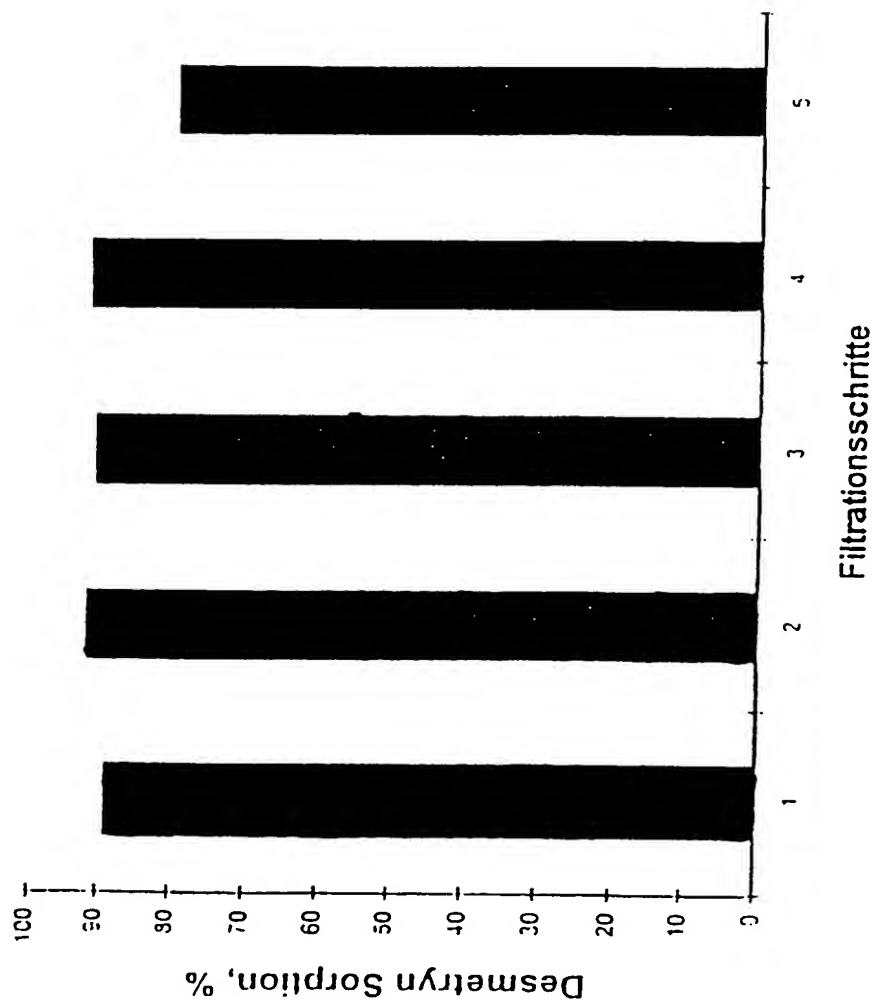
Figur 6

6/10



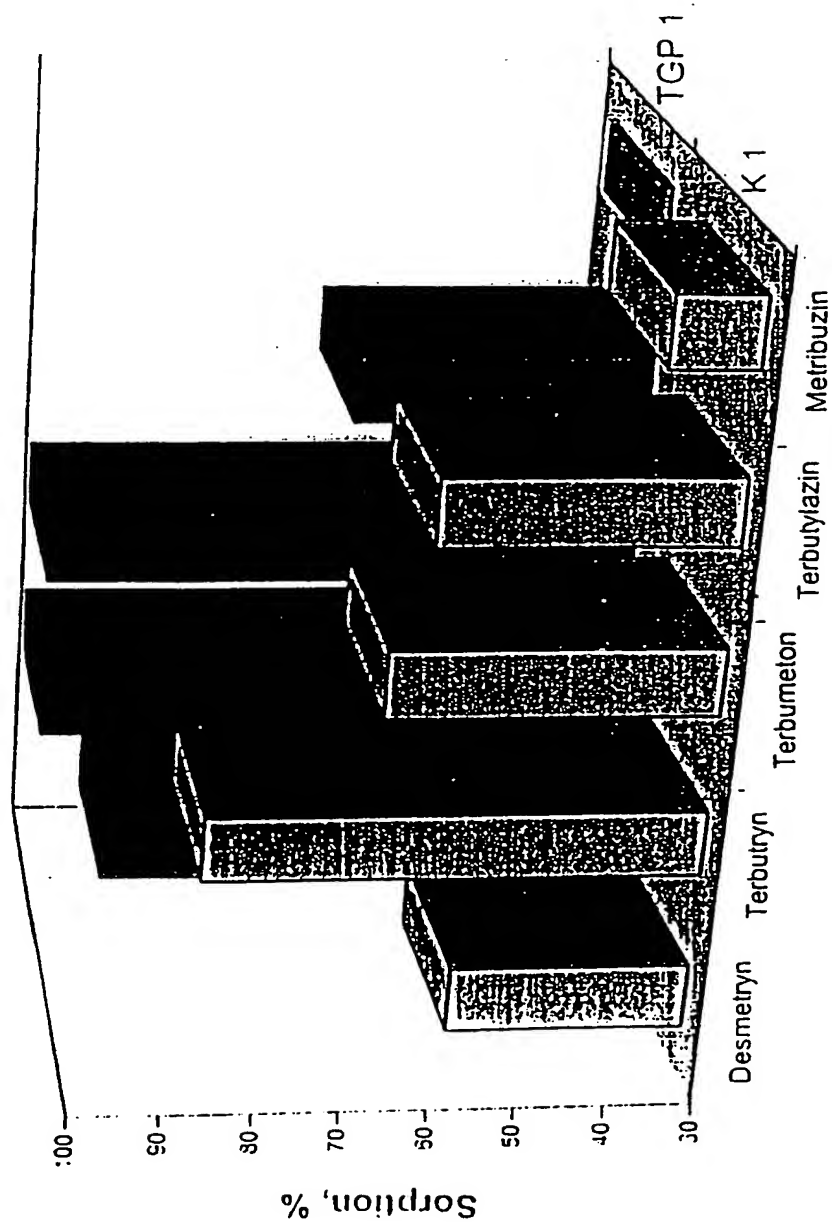
Figur 7

7/10



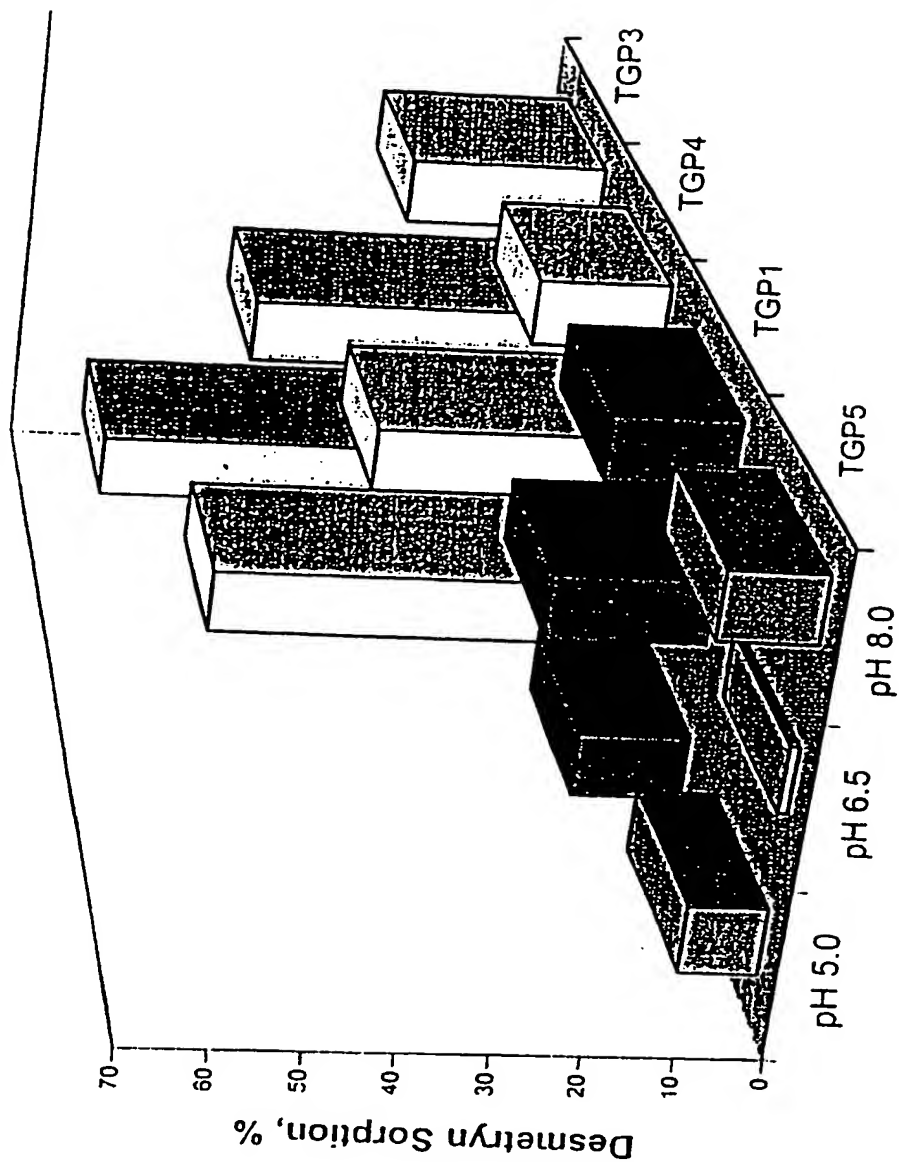
Figur 8

8/10



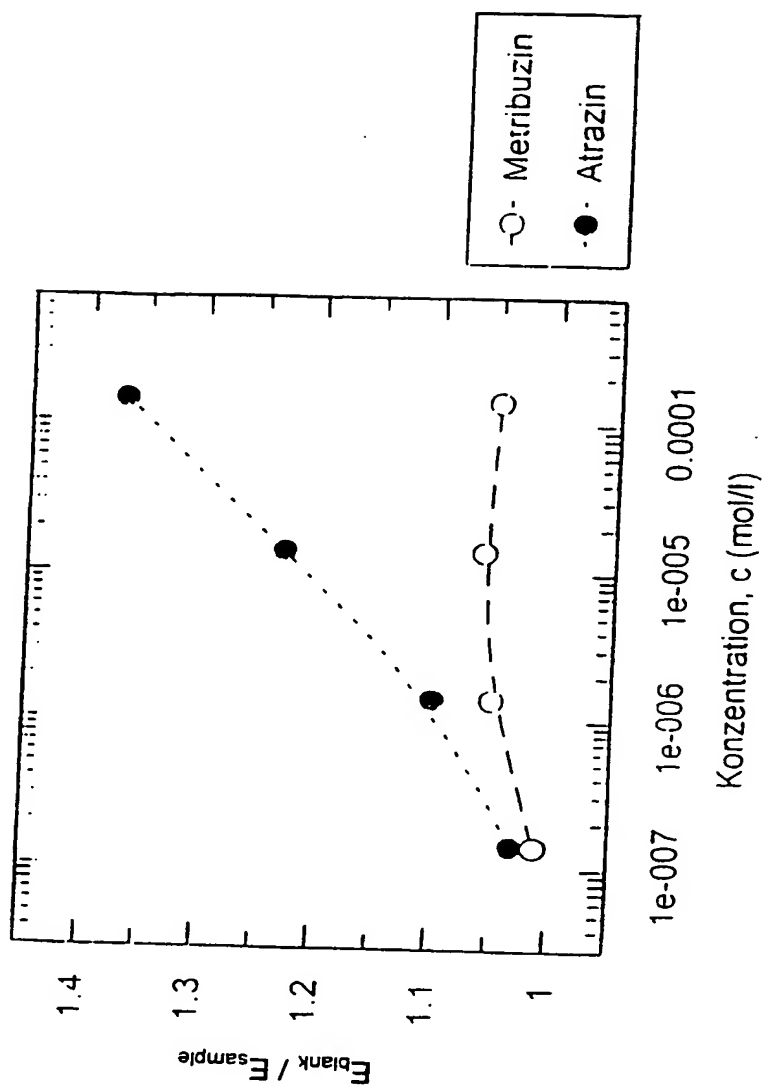
Figur 9

9/10



Figur 10

10/10



PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁷ : B01D 69/02, 67/00, 61/24, 61/42, 15/08, B01J 20/00, C12N 11/00, G01N 30/00, 33/50		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 00/07702 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. Februar 2000 (17.02.00)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE99/02429 (22) Internationales Anmeldedatum: 2. August 1999 (02.08.99) (30) Prioritätsdaten: 198 36 180.7 3. August 1998 (03.08.98) DE 198 55 290.4 24. November 1998 (24.11.98) DE 199 36 992.5 2. August 1999 (02.08.99) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): POLY-AN GMBH [DE/DE]; Rudower Chaussee 30, D-12489 Berlin (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): ULBRICHT, Mathias [DE/DE]; Landsberger Allee 89, D-10407 Berlin (DE). PILETSKI, Sergiy [UA/UA]; Teremkovskaya, 21/4, Kiev 187 252187 (UA). SCHEDLER, Uwe [DE/DE]; Torstrasse 12, D-10119 Berlin (DE). MATUSCHEWSKI, Heike [DE/DE]; Schillingstrasse 30, D-10179 Berlin (DE). (74) Anwalt: WEHLAN, Helmut; Paul-Gesche-Strasse 1, D-10315 Berlin (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchen- berichts: 20. April 2000 (20.04.00)	
(54) Title: TEMPLATE-TEXTURED MATERIALS, METHODS FOR THE PRODUCTION AND USE THEREOF (54) Bezeichnung: TEMPLAT-GEPRÄGTE MATERIALIEN, VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG (57) Abstract <p>The invention relates to template-textured materials in the form of template-textured polymers (TGP) on various surfaces including membranes (TGM template-textured membranes). Said materials are created by modifying the surface of solid carriers, which, by cross-linking polymerization of functional monomers initiated on the surface of said solid carriers in the presence of a template, leads to stable template prints that subsequently bind template molecules or template derivatives in a specific manner. The invention also relates to methods for the production of TGPs and to the use thereof for substance-specific separation of materials.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft Templat-geprägte Materialien in Gestalt Templat-geprägter Polymere (TGP) auf beliebigen Oberflächen, wozu auch Membranen gehören (Templat-geprägte Membranen, TGM). Sie entstehen durch Modifizierung der Oberfläche von festen Trägern, die auf dem Wege einer an der Trägeroberfläche initiierten vernetzenden Polymerisation funktioneller Monomere in Gegenwart eines Templates zu stabilen Templatabdrukken führt, die anschließend Templatmoleküle oder Templatderivate spezifisch binden. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung von TGP und ihre Verwendung für die substanzspezifische Stofftrennung.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/02429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 B01D69/02 B01D67/00 B01D61/24 B01D61/42 B01D15/08 B01J20/00 C12N11/00 G01N30/00 G01N33/50		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 B01D B01J C12N G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 764 680 A (THOMSON CSF) 26 March 1997 (1997-03-26) column 3, line 25 -column 4, line 9 column 7, line 4 -column 8, line 52; figures 1,2 ---	1-5,9
X	WO 97 22410 A (BYFIELD MARK PHILIP ;MARCONI GEC LTD (GB)) 26 June 1997 (1997-06-26) page 1, paragraph 1 - paragraph 4 page 4, line 20 - line 33 page 6, line 3 -page 9, line 4 page 18, line 14 -page 19, paragraph 3 ---	1-6,9,10
X	WO 94 16319 A (NILSSON KURT ;SELLERGREN BOERJE (SE)) 21 July 1994 (1994-07-21) page 2, line 10 -page 3; examples 1-6 --- -/--	1-5,8
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex. </div>		
<div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>* Special categories of cited documents :</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p> </div> </div>		
Date of the actual completion of the international search <div style="text-align: center; font-weight: bold;">9 February 2000</div>		Date of mailing of the international search report <div style="text-align: center; font-weight: bold;">15/02/2000</div>
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer <div style="text-align: center; font-weight: bold;">Edmueller, P</div>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 99/02429

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 41235 A (OREGON STATE ;ADVANCED MICROBIOTICS CORP (US)) 19 December 1996 (1996-12-19) page 2, line 26 -page 3, line 32 page 4, line 34 -page 5, line 31 page 9, line 24 -page 17, line 24; examples 1-3 ---	1,5,9
X	US 5 786 428 A (ARNOLD FRANCES H ET AL) 28 July 1998 (1998-07-28) cited in the application column 2, line 60 -column 3, line 8 column 3, line 43 - line 56 column 7, line 61 - line 67 column 9, line 64 -column 10, line 62 column 11, line 21 -column 13, line 36 ---	1,5,8
X	WO 93 05068 A (GLAD MAGNUS ;KEMPE MARIA (SE); MOSBACH KLAUS (SE)) 18 March 1993 (1993-03-18) page 1, line 4 - line 9 page 3, line 1 -page 6, line 4 page 6, line 16 -page 7, line 37 -----	1,5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 99/02429

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0764680	A	26-03-1997	FR 2738831 A JP 9132665 A US 5841493 A	21-03-1997 20-05-1997 24-11-1998
WO 9722410	A	26-06-1997	GB 2308369 A EP 0956156 A	25-06-1997 17-11-1997
WO 9416319	A	21-07-1994	NONE	
WO 9641235	A	19-12-1996	US 5587273 A AU 6170896 A EP 0830639 A JP 11508356 T	24-12-1996 30-12-1996 25-03-1998 21-07-1999
US 5786428	A	28-07-1998	NONE	
WO 9305068	A	18-03-1993	AT 176238 T AU 2561692 A DE 69228312 D DE 69228312 T EP 0602154 A JP 6510474 T SE 9102622 A	15-02-1999 05-04-1993 11-03-1999 26-08-1999 22-06-1994 24-11-1994 07-03-1993

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. nationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02429

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01D69/02 B01D67/00 B01D61/24 B01D61/42 B01D15/08
B01J20/00 C12N11/00 G01N30/00 G01N33/50

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 B01D B01J C12N G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 0 764 680 A (THOMSON CSF) 26. März 1997 (1997-03-26) Spalte 3, Zeile 25 - Spalte 4, Zeile 9 Spalte 7, Zeile 4 - Spalte 8, Zeile 52; Abbildungen 1,2	1-5,9
X	WO 97 22410 A (BYFIELD MARK PHILIP ; MARCONI GEC LTD (GB)) 26. Juni 1997 (1997-06-26) Seite 1, Absatz 1 - Absatz 4 Seite 4, Zeile 20 - Zeile 33 Seite 6, Zeile 3 - Seite 9, Zeile 4 Seite 18, Zeile 14 - Seite 19, Absatz 3	1-6,9,10
X	WO 94 16319 A (NILSSON KURT ; SELLERGREN BOERJE (SE)) 21. Juli 1994 (1994-07-21) Seite 2, Zeile 10 - Seite 3; Beispiele 1-6	1-5,8
	-/-	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. Februar 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

15/02/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Edmueller, P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>WO 96 41235 A (OREGON STATE ;ADVANCED MICROBIOTICS CORP (US)) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) Seite 2, Zeile 26 -Seite 3, Zeile 32 Seite 4, Zeile 34 -Seite 5, Zeile 31 Seite 9, Zeile 24 -Seite 17, Zeile 24; Beispiele 1-3</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,5,9
X	<p>US 5 786 428 A (ARNOLD FRANCES H ET AL) 28. Juli 1998 (1998-07-28) in der Anmeldung erwähnt Spalte 2, Zeile 60 -Spalte 3, Zeile 8 Spalte 3, Zeile 43 - Zeile 56 Spalte 7, Zeile 61 - Zeile 67 Spalte 9, Zeile 64 -Spalte 10, Zeile 62 Spalte 11, Zeile 21 -Spalte 13, Zeile 36</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,5,8
X	<p>WO 93 05068 A (GLAD MAGNUS ;KEMPE MARIA (SE); MOSBACH KLAUS (SE)) 18. März 1993 (1993-03-18) Seite 1, Zeile 4 - Zeile 9 Seite 3, Zeile 1 -Seite 6, Zeile 4 Seite 6, Zeile 16 -Seite 7, Zeile 37</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1,5

INTERNATIONAL RESEARCH REPORT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 99/02429

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0764680 A	26-03-1997	FR 2738831 A JP 9132665 A US 5841493 A	21-03-1997 20-05-1997 24-11-1998
WO 9722410 A	26-06-1997	GB 2308369 A EP 0956156 A	25-06-1997 17-11-1997
WO 9416319 A	21-07-1994	KEINE	
WO 9641235 A	19-12-1996	US 5587273 A AU 6170896 A EP 0830639 A JP 11508356 T	24-12-1996 30-12-1996 25-03-1998 21-07-1999
US 5786428 A	28-07-1998	KEINE	
WO 9305068 A	18-03-1993	AT 176238 T AU 2561692 A DE 69228312 D DE 69228312 T EP 0602154 A JP 6510474 T SE 9102622 A	15-02-1999 05-04-1993 11-03-1999 26-08-1999 22-06-1994 24-11-1994 07-03-1993